

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**Evaluación de marcadores moleculares Ilps y Strs
heterólogos en la anchoveta peruana Engraulis
Ringens para estudios poblacionales**

TESIS

para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo

AUTOR

Diana Elizabeth Rojas Málaga

Lima – Perú

2011



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ILPs y STRs

HETERÓLOGOS EN LA ANCHOVETA PERUANA *Engraulis*

ringens PARA ESTUDIOS POBLACIONALES

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista

Biotecnólogo

Bach. DIANA ELIZABETH ROJAS MÁLAGA

Asesor interno: Blgo. ROGER QUIROZ BAZÁN

Asesor externo: PhD. RICARDO FUJITA ALARCÓN

Lima - Perú

2011

Dedico esta tesis a las personas que confiaron en mí,
mis padres, María Del Carmen Málaga De Los Santos y

Erasmus Teodoro Rojas Berrospi,
quienes me alientan a dar cada día un paso más.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial de mi vida.

A mis padres, María del Carmen Málaga De Los Santos, Erasmo Rojas Berrospi; mi hermana, Claudia Rojas Málaga y mis abuelos, Moisés Málaga Baldárrago y Olinda De Los Santos Herrera, por su cariño y por ser el ejemplo más perfecto del amor eterno.

A mis maestros, que me enseñaron más que números y letras, Roger Quiroz Bazán, Ricardo Fujita Alarcón, Daniel Oré Chávez, Oscar Acosta, María Luisa Guevara y Margarita Velásquez Reinoso, por compartir generosamente sus conocimientos y atreverse a confiar en mí, ustedes son la base de mi vida profesional y toda la vida les estaré agradecida.

A mis amigos y colegas del Centro de Genética y Biología Molecular, Erika Castillo Carrión, Verónica Mendoza Reinoso, Mayra Silva Valle, Solange Paredes Moscoso y Claudio Villegas Llerena, por los días en el laboratorio y fuera de éste, llenos de risas y anécdotas que nunca olvidaré. Y de manera especial a César Carvallo Muguerza, porque en estos últimos ocho años que compartimos juntos me brindó su amistad incondicional y siempre tiene una mano extendida dispuesta a ayudarme en los momentos más difíciles y estresantes. Gracias a todos ustedes, porque sé que tengo a alguien en quien puedo confiar, con quien puedo llorar, con quien puedo reír, con quien puedo cantar.

A la ilustre Universidad Nacional Mayor de San Marcos, mi casa de estudio, mi segundo hogar, en cuyas aulas pasé los mejores cinco años de mi vida; y a la Escuela Académico

Profesional de Genética y Biotecnología, la cual me brindó más que conocimientos teóricos.

Y al proyecto FINNCyT-2008 PIN 115: "Plataforma Tecnológica para evaluar la biodiversidad de recursos marinos: Producción de marcadores genéticos y determinación genético-poblacional de 4 especies peruanas de importancia económica: anchoveta (*Engraulis ringens*), merluza (*Merluccius gayi*), concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) y puta (*Dosidicus gigas*)" por el financiamiento de la presente tesis.

ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius
μl	Microlitros
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
AMOVA	Análisis de varianza molecular
Cam-3	Intrón 3 del gen de la calmodulina
CGBM	Centro de Genética y Biología Molecular
Ck-7	Intrón 7 del gen de la creatina quinasa
cm	Centímetros
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
Ee10	<i>Engraulis encrasicolus</i> 10
Ee2	<i>Engraulis encrasicolus</i> 2
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
EPIC	Exon Primed Intron Crossing
FAO	Food and Agriculture Organization
FINCyT	Financiamiento para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología
Gh-5	Intrón 5 del gen de la hormona del crecimiento
He	Heterocigosidad esperada
Ho	Heterocigosidad observada
ILP	Intron length polymorphism
IMARPE	Instituto del Mar del Perú
ITS	Internal transcribed spacer
M	Molar

mg	Miligramos
ml	Mililitro
Mlc-3	Intrón 3 del gen de la cadena ligera de la miosina
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PIN	Proyecto de Interés Nacional
pmol	Picomol
rpm.	Revoluciones por minuto
RAPD	Random Amplification of polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ácido ribonucleico
STR	Short Tandem Repeat
T°a	Temperatura de hibridación
TE	Tris:EDTA
U	Unidades
UPS	Unidades prácticas de salinidad
USMP	Universidad San Martín de Porres
UV	Ultravioleta

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
II.1. La anchoveta <i>Engraulis ringens</i>	3
II.1.1. Posición taxonómica de la anchoveta	3
II.1.2. Características de la especie	4
II.1.3. Patrones de distribución	4
II.1.4. Aspectos biológicos	4
II.2. Marcadores moleculares	5
II.2.1. Ventajas de los marcadores moleculares	6
II.2.2. Clasificación	7
II.2.3. Características	7
II.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	8
II.4. Marcadores microsatélites	9
II.4.1. Características	10
II.4.2. Clasificación	11
II.4.3. Limitaciones	11
II.4.4. Alelos nulos, homoplasias y microsatélites	14

II.4.4.1. Alelos nulos	14
II.4.4.2. Homoplasia	14
II.4.5. Estrategia de amplificación cruzada	15
II.5. Marcadores intrónicos	15
II.5.1. Técnica <i>Exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR</i>	16
II.5.2. Evaluación de polimorfismos y estudios poblacionales	17
II.6. Cálculo de frecuencias alélicas	17
II.7. Equilibrio de Hardy-Weinberg	18
II.8. Pruebas para calcular la desviación del Equilibrio de Hardy-Weinberg	19
II.9. Heterocigosis	20
II.9.1. Heterocigosidad Observada (H_o)	20
II.9.2. Heterocigosidad esperada o Diversidad genética (H_e)	21
II.10. Índices de Fijación o Estadísticos F	21
II.11. Avances en el estudio de la estructura poblacional de la anchoveta peruana	22
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
IV.MATERIALES Y MÉTODOS	25
IV.1. Material biológico	25

IV.2. Metodología	27
IV.2.1. Extracción de ácidos nucleicos y visualización	27
IV.2.2. Amplificación de los marcadores ILPs y STRs mediante PCR	28
IV.2.3. Visualización de amplicones	32
IV.2.4. Caracterización de los loci ILPs y STRs	32
IV.2.4.1. Diversidad genética	32
IV.2.4.2. Índices de Fijación o Estadísticos F	33
IV.2.4.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg	33
IV.2.4.4 Variación genética interpoblacional de <i>E. ringens</i>	33
IV.2.4.5. Incidencia de alelos nulos	33
V. RESULTADOS	34
V.1. Extracción de DNA	34
V.2. Estandarización de la técnica de PCR para la amplificación de los ILPs y STRs en anchoveta peruana <i>E. ringens</i> .	35
V.3. Amplificación, genotipaje y caracterización molecular de los loci ILPs y STRs	40
V.3.1. ILPs	40
V.3.1.1 Intrón 3 de la cadena ligera de la miosina (Mlc-3)	40

V.3.1.2. Intrón 7 de la creatina quinasa (Ck-7)	48
V.3.2. STRs	
V.3.2.1. Ee10 (<i>Engraulis encrasicolus</i> 10)	56
VI. DISCUSIÓN	68
VII. CONCLUSIONES	75
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

RESUMEN

A pesar de la importancia económica de la anchoveta peruana, *Engraulis ringens*, en nuestro país, no existe información acerca de la variabilidad y estructura genético-poblacional de esta especie, principalmente porque no se han identificado marcadores moleculares específicos.

Por esta razón, se evaluó la utilidad de cinco marcadores moleculares para la caracterización molecular de la anchoveta peruana: dos microsatélites, Ee10 y Ee2, reportados en la anchoveta europea *E. encrasicolus*, y tres marcadores intrónicos, basados en el polimorfismo en longitud: el intrón 3 de la cadena ligera de la miosina Mlc-3, el intrón 7 de la creatina quinasa Ck-7 y el intrón 5 de la hormona de crecimiento Gh-5. Dos de ellos, el microsatélite Ee2, y el marcador intrónico Gh-5, no amplificaron en esta especie. Para el locus Ee10, se encontraron altas probabilidades de existencia de alelos nulos, 0.2005-0.7420, lo que explicaría el déficit significativo de heterocigotos encontrado. Basándose en la heterocigosidad, se reporta un nivel bajo de polimorfismo para Mlc-3 y un nivel alto para Ck-7. Los resultados muestran que sólo Ck-7 puede ser utilizado en futuros estudios poblacionales. Este marcador sugiere que las seis capturas colectadas a lo largo del litoral peruano, una del stock norte (Salaverry) y cinco del centro (Callao, Huacho, Supe y Pisco), constituyen una misma unidad reproductiva, desde un punto de vista genético.

Palabras clave: Anchoveta peruana, marcador intrónico, marcador microsatélite, amplificación cruzada, EPIC-PCR, estudios genéticos.

ABSTRACT

Despite *Engraulis ringens* economic importance in our country, there is a lack of information about the variability and genetic population structure of this species, where no specific molecular markers have been identified.

For this reason, five molecular markers were evaluated for the molecular characterization of the Peruvian anchovy: two microsatellites, Ee10 and Ee2, reported in the european anchovy *E. encrasicolus*, and three intronic length polymorphism markers (ILPs): myosin light chain intron 3 Mlc-3, creatin kinase intron 7 Ck-7 and the growth hormone intron 5 Gh-5. Two of them, the microsatellite Ee2 and the intronic marker Gh-5, did not amplify in this species. For Ee10 locus, there was a high probability of presence of null alleles, ranging from 0.2005 to 0.7420, which would explain the significant heterozygote deficiencies found. Based on the observed heterozygosity, a low polymorphism is reported for Mlc-3 and a high one for Ck-7. The results show that only Ck-7 can be used in future population studies. This marker suggests that the six collected sacks along the Peruvian coast, a northern stock (Salaverry) and five from the centre (Callao, Huacho, Supe and Pisco), constitute a single reproductive unit from a genetic point of view.

Keywords: Peruvian anchovy, intronic marker, microsatellite marker, cross amplification, EPIC-PCR, genetic studies.

I. INTRODUCCIÓN

La anchoveta peruana es una de las especies hidrobiológicas más abundantes en el Océano Pacífico Sur, es una gran generadora de divisas y fuente de alimentación para nuestro país. Sin embargo, no se han realizado estudios de su estructura genética poblacional debido a la falta de marcadores genéticos para su estudio. Dicha información es de suma importancia para un manejo adecuado del recurso; nuestra industria crece y en el presente es la segunda industria pesquera más grande del mundo, luego de China. Si la información sobre la estructura genética de las poblaciones no está incorporada en las prácticas de gestión, la erosión de la variabilidad genética puede pasar desapercibida, y la capacidad de las especies para adaptarse a los cambios ambientales podría perderse.

En este contexto los marcadores moleculares son herramientas útiles. Por lo tanto la creación de información genética de la anchoveta por medio de técnicas moleculares es importante para adecuar estrategias de manejo según su abundancia.

Actualmente, los marcadores moleculares microsatélites son los más usados en la ecología molecular. Una estrategia para obtener estos loci es construir una librería genómica. Aunque clonarlos es relativamente simple, su desarrollo requiere de experiencia en el campo de la biología molecular, así como tiempo y recursos. Una estrategia alternativa es probar primers descritos en especies cercanamente relacionadas. Esta estrategia de amplificación cruzada es efectiva sólo si las regiones flanqueantes de los *primers* están conservadas entre especies.

De igual manera se propone el uso de intrones debido a que acumulan rápidamente mutaciones y suelen mostrar una alta variabilidad genética, incluyendo polimorfismo de longitud. Al respecto, varios trabajos han demostrado que la técnica *Exon-Primed Intron-*

Crossing (EPIC) *Polymerase Chain Reaction* (PCR), permite utilizar el polimorfismo en longitud de los intrones (ILPs) como un marcador genético en el estudio de poblaciones de varios vertebrados e invertebrados. De esta manera, se utilizó la variación generada por mutaciones grandes (inserción o delección), como la medida de polimorfismo en la longitud de los fragmentos intrónicos.

Es así que la presente tesis tiene como objetivo la evaluación de marcadores genéticos heterólogos en esta especie de importancia económica para su uso posterior en estudios genéticos como la caracterización de su variabilidad genética, la identificación de unidades poblacionales, identificación de especie, etc. Se evaluó la utilidad de 3 marcadores ILPs y 2 STRs mediante la técnica *EPIC-PCR* y amplificación cruzada respectivamente, para futuros estudios poblacionales.

La presente investigación se realizó bajo la asesoría del Blgo. Roger Quiroz Bazán, en el Laboratorio de Artes y Métodos de Pesca de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y del Ph.D. Ricardo Fujita Alarcón, en el Centro de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Martín de Porres, y forma parte del proyecto FINCyT-2008 PIN 115: "Plataforma Tecnológica para evaluar la biodiversidad de recursos marinos: Producción de marcadores genéticos y determinación genético-poblacional de 4 especies peruanas de importancia económica: Anchoqueta (*Engraulis ringens*), Merluza (*Merluccius gayi*), Concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) y Pota (*Dosidicus gigas*)" financiado por el FINCyT (Financiamiento para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología)

II. MARCO TEORICO

La anchoveta peruana (*Engraulis ringens*), es una de las especies hidrobiológicas más abundantes en el Océano Pacífico Sur. En Perú, se destina usualmente a la elaboración de harina y aceite. Existe actualmente un interés comercial para el consumo humano directo de esta especie.

II.1 La Anchoveta *Engraulis ringens*

Nombre Científico: *Engraulis ringens*

Nombre Común: Anchoveta.

Nombre en Inglés: Anchovy

Nombre FAO: Anchoveta peruana

II.1.1 Posición taxonómica de la anchoveta

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Clupeiformes

Familia: Engraulidae

Género: *Engraulis*

Especie: *E. ringens*

II.1.2 Características de la especie

La anchoveta es una especie pelágica, en su etapa adulta alcanza una longitud que oscila entre 12 y 16 centímetros. Su cuerpo es alargado poco comprimido, cabeza larga, el labio superior se prolonga en un hocico y sus ojos son muy grandes. Su color varía de azul oscuro a verdoso en la parte dorsal y es plateada en el vientre. Vive en aguas moderadamente frías, con rangos que oscilan entre los 16° a 23°C en verano y de 14° a 18°C en invierno. La salinidad puede variar entre 34,5 y 35,1 UPS. La anchoveta tiene hábitos altamente gregarios formando extensos cardúmenes que en periodos de alta disponibilidad, facilita que sus capturas sean de gran magnitud.

II.1.3 Patrones de distribución y abundancia

Se encuentra distribuida desde Punta Aguja, en Perú (5°50S) hasta Lota, en Chile (37°04 S.L.). Existen dos grandes stocks (Pauly, D y I. Tsukayama, 1987): Uno en el área norte-centro del Perú (Punta Pariñas-San Juan), y otro en el sur Peruano y norte Chileno (Figura 1).

II.1.4 Aspectos biológicos

La anchoveta es una especie de crecimiento rápido, su ingreso a la pesquería ocurre a una talla de 8-9 centímetros de longitud total, principalmente entre diciembre y abril, siendo los grupos de edad de uno y dos años los que constituyen mayormente las capturas. La anchoveta se reproduce todo el año, pero especialmente entre julio y setiembre y en menor proporción durante los meses de febrero y marzo. Tiene dimorfismo sexual, alcanza su madurez sexual a los 12 cm y se reproduce mediante la producción de huevos, que son fertilizados por el macho en el agua y el embrión se desarrolla fuera del cuerpo de la hembra. Esta especie es planctófaga por excelencia, es decir que se alimenta exclusivamente de plancton (fitoplancton y zooplancton). Durante eventos El

Niño, la anchoveta se alimenta mayormente de copépodos y eufausidos; disminuyendo el consumo de fitoplancton en su dieta.

En los periodos normales es capturada en la franja costera, dentro de las 60 millas náuticas y a profundidades menores de 100 metros. Su distribución vertical esta en relación con las condiciones ambientales.

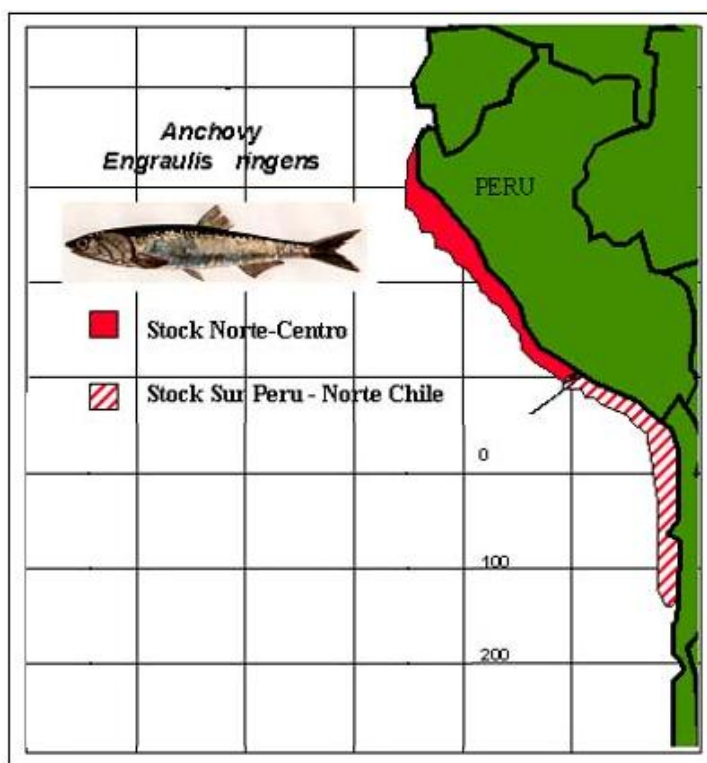


Figura 1. Stocks pesqueros de *E. ringens*.

Fuente: www.fao.org

II.2 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son aquellas moléculas (proteínas o DNA) que se pueden identificar y caracterizar para definir un genotipo determinado.

Con la finalidad de identificar o describir unidades poblacionales de los diversos recursos hidrobiológicos se ha recurrido al uso de marcadores moleculares (Ferrada *et al.*, 2002), marcadores biológicos, morfometría corporal y fauna parasitaria.

II.2.1 Ventajas de los Marcadores Moleculares

Las técnicas que utilizan marcadores moleculares son necesarias en muchos campos de la biología como la evolución, la ecología, y los estudios de biodiversidad. Entre estos marcadores tenemos: alozimas, DNA mitocondrial y DNA nuclear. Además nos permiten conocer como se encuentra la proporción de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de DNA.

Los marcadores morfológicos, fenotipos de fácil identificación visual, cuentan con una serie de desventajas en relación a los marcadores moleculares. A pesar de que son fácilmente disponibles y requiere de un equipo sencillo para su análisis, existe la posibilidad de interferencia epistática o ambiental, y en su mayoría pueden utilizarse solamente cuando la especie bajo estudio se encuentra entera o en fase adulta.

De la misma manera, las alozimas, marcadores proteicos, son marcadores universales y fueron las únicas usadas en décadas pasadas antes del desarrollado de las técnicas basadas en el DNA. Una de las principales limitantes ha sido siempre la necesidad de muestras de tejido congeladas que son difíciles de mantener en cadena de frío si el sitio de muestro es remoto del laboratorio. Otra desventaja puede ser el bajo grado de polimorfismo.

II.2.2 Clasificación

Los marcadores moleculares tienen enorme importancia en la investigación genética actual. Estos se pueden clasificar de la siguiente manera (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997):

- Técnicas basadas en la hibridación: Incluye principalmente los RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) donde las sondas son hibridadas a membranas que contienen DNA fragmentado por enzimas de digestión.
- Técnicas basadas en PCR que usan *primers* arbitrarios o amplifican multi-locus: Tiene la característica de no necesitar mayor información de la secuencia del genoma que se está investigando. Se pueden mencionar a los RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) y los AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).
- Técnicas basadas en PCR de secuencia específica: En las cuales un requisito necesario es el conocimiento de la secuencia de las zonas flanqueantes para la obtención de *primers*. Dentro de esta categoría cabe mencionar a los microsatélites y marcadores intrónicos,.

II.2.3 Características

Un marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad (Cheng y Crittenden, 1994):

- a. Alto grado de polimorfismo (para evitar los problemas de homoplasia).
- b. Ser selectivamente neutros.
- c. Deben ser codominantes para la cuenta directa de los genotipos diploides.

- d. Ser heredados de una forma mendeliana.

Desde un punto de vista práctico:

- a. La técnica para analizar el marcador debe ser rápida y práctica.
- b. Debe poder repetirse con fiabilidad en otros laboratorios.

II.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es considerada una técnica biotecnológica cuya finalidad es la duplicación exponencial, *in vitro*, de una región específica de DNA para su respectiva evaluación.

Para su desarrollo requiere de los siguientes elementos: dos oligonucleótidos sintéticos o *primers*, que deben ser complementarios a la región de interés y generalmente únicos para el microorganismo de estudio, lo que proporciona la alta especificidad; una enzima termoestable: *Taq* polimerasa, proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* y 4 desoxyribonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

Este procedimiento, permite obtener la duplicación exponencial de la secuencia de interés por medio de 3 pasos fundamentales en un proceso cíclico (Figura 2); es decir, cada ciclo consta de un proceso de desnaturalización (95°C) que permite la apertura de la doble cadena, seguido de un proceso de hibridación (40-65°C), que consiste en la unión o el apareamiento de los oligonucleótidos o *primers* que se encuentran en la mezcla de reacción con los extremos 3' de la secuencia del DNA, formando una unión ayudada por enlaces iónicos (*primers* y hebra de DNA); en donde la enzima *Taq* polimerasa se pueda unir y comenzar en presencia de los 4 nucleótidos trifosfatos con la tercera etapa que es la fase de síntesis (72°C), la cual se refiere al copiado del templado que se van uniéndose por enlaces iónicos dando como resultado una nueva molécula del fragmento de DNA de

interés. Todos estos cambios de temperatura los realiza un equipo denominado termociclador.

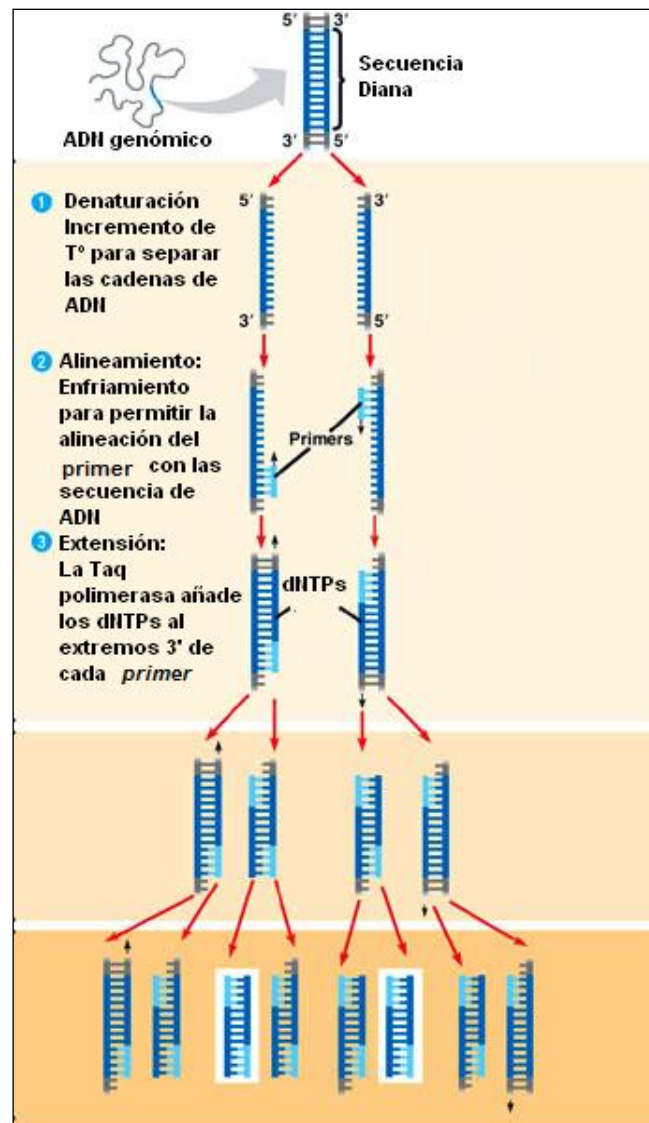


Figura 2. Diagrama de la Reacción en Cadena de la Polimerasa donde ocurre una amplificación exponencial.

II.4 Marcadores microsatélites

También denominados STRs (*short tandem repeats*) (Hancock, 1999).

II.4.1 Características

Los microsátélites son secuencias de DNA constituidas por repeticiones en tándem de unidades de 2-6 nucleótidos (Figura 3). La variación en el número de repeticiones es lo que constituye los múltiples alelos, transformándolos en marcadores muy polimórficos (Tautz 1986, Gibbs *et al.*, 1997). Parece ser que éstos se generan por un fenómeno de deslizamiento sobre la secuencia repetida durante la replicación de DNA (Schlötterer y Tautz 1992).

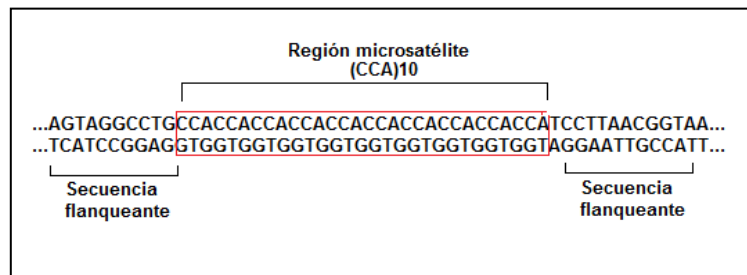


Figura 3. Representación gráfica de una secuencia microsatélite trinucleotídica (CCA)

Su análisis está basado en la amplificación por PCR, los fragmentos producidos son separados de acuerdo a su longitud en pares de base a través de una electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción en nitrato de plata o bromuro de etidio. Partiendo de la hipótesis de que en un microsatélite sólo varía el número de repeticiones dentro del motivo repetitivo; fragmentos que tienen el mismo tamaño, tienen la misma secuencia, de manera que todos los fragmentos de un mismo tamaño representarían un alelo.

De este modo, el análisis de los microsátélites se realizara de forma fácil, rápida, a bajo costo y la cantidad de DNA inicial necesaria para su realización es mínima. (Cheng *et al.*, 1995, Luikart y England, 1999).

La detección de estos marcadores se automatiza fácilmente, son muy polimórficos y tienen buena resolución analítica. Todo esto los convierte en una alternativa preferida como marcadores.

II.4.2 Clasificación

Chambers y MacAvoy (2000) proponen que los términos “puro” (o perfecto), “compuesto” y “complejo” se utilicen para especificar que uno, dos o más tipos de motivos, respectivamente, se encuentran presentes a lo largo de un locus microsatélite dado, y que el término interrumpido (o imperfecto) como un descriptor jerárquico adicional que implica una o más unidades no repetitivas en el interior de los microsatélites.

Tabla 1. Tipos de microsatélites

Tipo de Microsatélite	Ejemplo
STR puro	(CAT) ₆
STR interrumpido puro	(CAT) ₅ TG (CAT) ₃
STR compuesto	(AAT) ₄ (AT) ₂
STR interrumpido compuesto	(CAT) ₃ TG (CAT) ₅ GA (TTA) ₆
STR complejo	(CAT) ₂ TG (GA) ₁₂ (CAT) ₅ GC (TTA) ₄₊₃

II.4.3 Limitaciones

Una de las limitaciones con menor frecuencia son las mutaciones, ocurridas en el sitio de apareamiento de los *primers*, y tendrían como resultado la presencia de alelos nulos. Otra limitación es la presencia de “bandas tartamudas” (Figura 4). Estas últimas se encuentran frecuentemente asociadas con la amplificación de DNA repetitivo como es el caso de los

microsatélites. Las “bandas tartamudas” son productos de la amplificación por PCR que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original. La ocurrencia de estos artefactos dificulta la lectura de los geles, e inclusive, repetidamente son confundidos como alelos, complicando el análisis genotípico. Sin embargo estas consideraciones no han desalentado a muchos investigadores quienes han convertido a los microsatélites en una herramienta muy popular (Chambers y MacAvoy 2000). Una vez que las secuencias de los *primers* son diseñadas y publicadas, el análisis de los loci microsatélites es práctico para cualquier laboratorio capaz de realizar las técnicas de PCR y electroforesis.

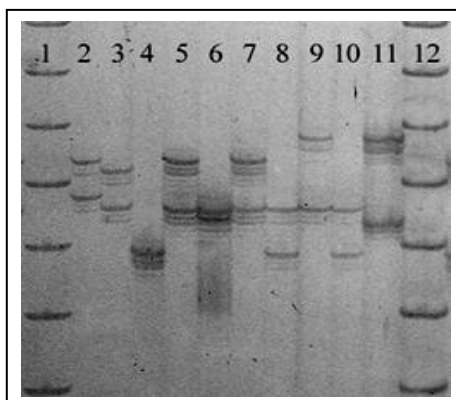


Figura 4. Gel de poliacrilamida (6%) mostrando variación en el número de STRs y la presencia de “bandas tartamudas”. Carril 1 y 12 contienen un marcador de peso molecular de 10pb.

Fuente: www.st-andrews.ac.uk/~merg/px/PAGE3.jpg

Como ya se mencionó, el elevado polimorfismo que presentan estos marcadores y la posibilidad de identificar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales (Figura 5).

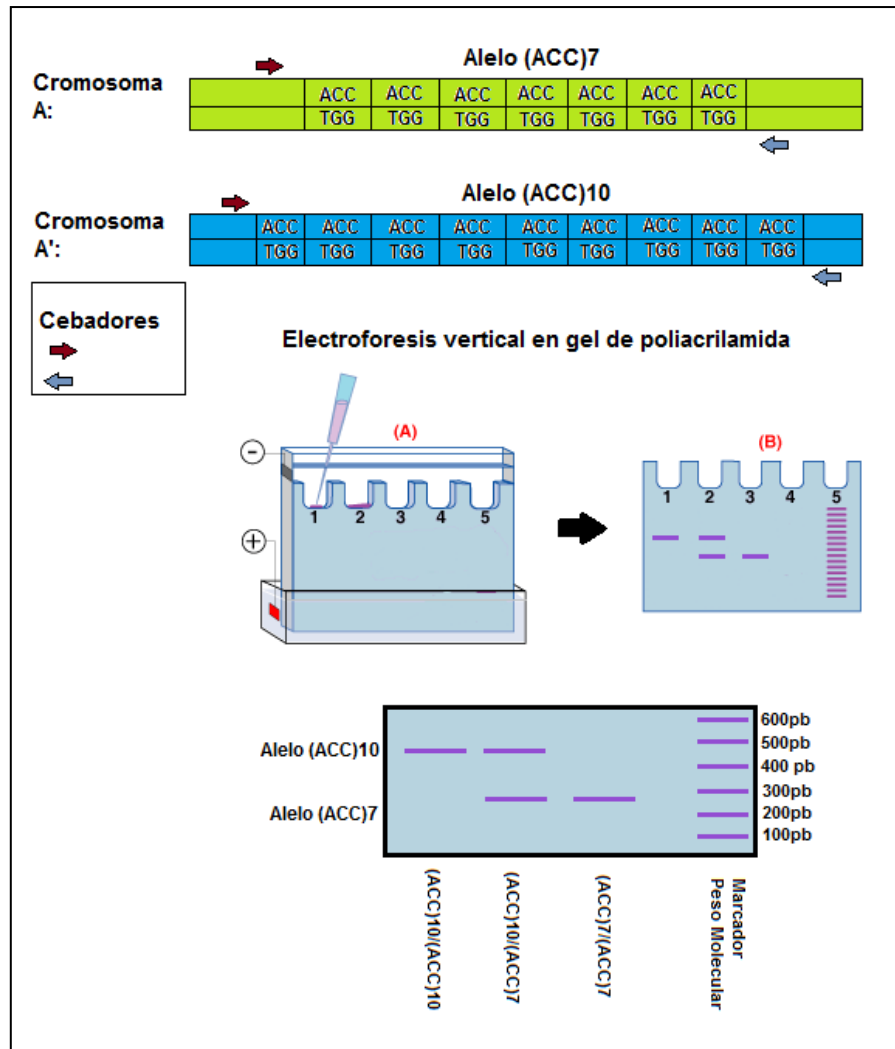


Figura 5. Diagrama que muestra el polimorfismo de longitud de los microsatélites. En un individuo diploide, el cromosoma A contiene el alelo (ACC)₇, mientras que el cromosoma A' en el locus homólogo presenta el alelo (ACC)₁₀. Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando *primers* diseñados en las regiones flanqueantes, los alelos son amplificados, para luego ser separados mediante una corrida electroforética. El diagrama muestra el patrón de bandas que determinan tanto los homocigotos como el heterocigoto para los mencionados alelos.

II.4.4 Alelos Nulos, homoplasia y microsatélites

Algunos factores pueden disminuir el poder y la sensibilidad de los microsatélites como marcadores de elección, o pueden ser fuente de error que disminuya su utilidad en los estudios genéticos. Los dos factores principales son los alelos nulos y la homoplasia.

II.4.4.1 Alelos nulos

Se habla de alelo nulo cuando un alelo no puede ser amplificado, debido principalmente, a una mutación en el punto de hibridación del *primer* (Callen *et al.*, 1993). Ese alelo no amplifica y el individuo es catalogado como homocigoto.

La existencia de alelos nulos es especialmente difícil de detectar cuando su frecuencia es baja. Otro método para sospechar la presencia de alelos nulos es el cálculo de la deficiencia de heterocigotos para el equilibrio *Hardy-Weinberg* (EHW).

Para solucionar este problema se pueden diseñar *primers* alternativos fuera de la mutación y volver a analizar a los individuos clasificados como homocigotos

II.4.4.2 Homoplasia

La homoplasia ocurre cuando dos alelos tienen el mismo tamaño pero no debido a que sean idénticos, sino a que existen diferencias en su estructura, inserciones de una parte y deleciones de otra, cambios de bases o variaciones en la región flanqueante (Primmer y Ellegren, 1998).

Este es un tipo de polimorfismo que se puede detectar únicamente por secuenciamiento, y puede pasar inadvertido cuando analizamos mediante amplificación por PCR y electroforesis para asignar tamaños. Puede ser una fuente de error en estudios poblacionales o de evolución, porque la tasa de mutación de los microsatélites está relacionada de forma compleja con el tamaño y composición del alelo, y, por ejemplo, los

alelos interrumpidos o compuestos conllevan con más frecuencia a casos de homoplasia (Tautz y Schlötterer 1994).

II.4.5 Estrategia de amplificación cruzada

Esta estrategia se basa en la conservación de secuencias genéticas entre especies con relativa cercanía evolutiva. En el caso de especies que no cuentan con marcadores especie-específica, como la anchoveta peruana (*E. ringens*), se puede recurrir a la estrategia de amplificación cruzada de microsatélites (usando *primers* reportados en otras especies), eliminando de esta manera la necesidad de desarrollar nuevos conjuntos de *primers*. Este tipo de amplificación es efectiva solamente si las regiones flanqueantes de los *primers* se encuentran conservadas entre especies, además se corre el riesgo de que no presente el mismo grado de polimorfismo que se reportó en la especie para la cual fueron diseñados.

II.5. Marcadores intrónicos

Los intrones son generalmente polimórficos y algunas veces hipervariables; son codominantes, selectivamente neutros; son fácilmente amplificados por PCR, su polimorfismo puede ser revelado fácilmente en geles de agarosa o acrilamida; y pueden ser obtenidas grandes cantidades a un bajo costo (Palumbi, S. y Baker C., 1994; Bierne *et al.*, 2000; Chow S., 1998; Chow S. y Hazama K., 1998; He M. y Haymer D.S., 1997).

Estas características del intrón son útiles porque potencialmente provee un número de polimorfismos con sólo un par de *primers*. Esta propiedad de universalidad de los *primers* también cuenta con algunas desventajas: El riesgo de contaminación humana. No es siempre posible evitar la contaminación pero esta es fácilmente detectable debido de los perfiles altamente específicos obtenidos para cada especie y para cada marcador intrónico.

Varios métodos pueden detectar los polimorfismos de intrón, incluyendo el secuenciamiento, el análisis por polimorfismo conformacional de cadena monocatenaria (SSCP) (Sunnucks *et al.*, 2000), los cuales son útiles para fragmentos pequeños de DNA (alrededor de 300pb). Mientras que analizar el polimorfismo de longitud del intrón (ILP) es una manera más rápida, reproducible, de bajo costo y se puede realizar en geles de poliacrilamida.

II.5.1 Técnica *Exon-primed intron-crossing* (EPIC)-PCR

Los intrones son secuencias muy variables no codificadoras que pueden alcanzar tamaños desde 80 a 1000 nucleótidos o más. A diferencia de los exones, su secuencia nucleotídica parece ser muy poco conservada y a veces puede alterarse significativamente sin afectar considerablemente la función del gen (Hassan *et al.*, 2002). De esta manera, las mutaciones que pueden ocurrir en los intrones, se acumulan rápidamente y a veces exhiben una alta variabilidad genética, incluyendo polimorfismos a nivel de su longitud (Palumbi, 1996; Chow y Takeyama 1998). Por este motivo, la posición de los *primers* que intervienen en la replicación de aquellos fragmentos están diseñados para operar desde los exones, a este enfoque se le denomina EPIC-PCR, introducido por Lessa (1992). Lo que se analiza son las variaciones generadas por mutaciones grandes, como inserciones o deleciones, como la medida de polimorfismo en la longitud de los fragmentos intrónicos y no aquellas producidas por mutaciones puntuales.

Las desventajas de la técnica radican en la amplificación simultánea de varios loci, que pueden revelar la presencia de pseudogenes. Esta multiamplicación interfiere en la calidad del PCR y dificulta la lectura de los genotipos (Hassan *et al.*, 2002).

II.5.2 Evaluación de polimorfismos y estudios poblacionales:

Los marcadores basados en ILPs amplificados por EPIC-PCR tienen muchas ventajas en estudio de genética de poblaciones: (i) al usar *primers* de genes heterólogos, el clonamiento y la secuenciación del blanco puede ser evitado, (ii) la amplificación cruzada debería ser más fácil debido a que las secuencias a partir de las cuales se diseñan los *primers* son exones, y estos tienden a ser más conservados entre especies, (iii) los artefactos de PCR como los alelos nulos son menos frecuentes.

Todas las características mencionadas hacen que este tipo de marcadores sean provechosos como marcadores de variación, en poblaciones y sub-poblaciones intra- e interespecíficos (Lessa 1992, Chow y Takeyama 1998). Varios trabajos han demostrado que la técnica EPIC-PCR, permite utilizar el polimorfismo de los intrones como un marcador genético en el estudio de las poblaciones de varios vertebrados (Palumbi & Baker, 1994; Chow & Takeyama, 1998; Chow y Hazama, 1998; Hasan *et al.*, 2002) e invertebrados (Ohresser *et al.*, 1997; Bierne *et al.*, 2000).

II.6. Cálculo de frecuencias alélicas

Una población, en sentido genético, no sólo es un grupo de individuos, sino un grupo reproductivo de forma que la constitución genética de los individuos se transmite de una generación a la siguiente (Falconer y Mackay 1996). Durante dicha transmisión los genotipos de los padres se disocian y un nuevo grupo de genotipos se constituye en la progenie. Los genes transmitidos en la población de esta forma tienen continuidad de generación en generación.

Se puede definir la frecuencia alélica como el cociente resultante de dividir el número de alelos iguales en una población entre el número total de alelos. El cálculo de las frecuencias alélicas se hace por recuento directo de los alelos presentes, asumiendo que

la observación de un solo alelo se corresponde con la condición de homocigosis, por lo tanto que no hay alelo nulo.

II.7. Equilibrio de *Hardy-Weinberg*

Para describir la constitución genética de una población tendríamos que determinar sus genotipos y decir cuántos individuos existen de cada uno de ellos, también se debe tener en cuenta la transmisión de los alelos de una generación a la siguiente. En dicha transmisión los genotipos de los padres se disocian y un nuevo grupo de genotipos se constituye en los hijos con los alelos transmitidos por los gametos, de esta forma los alelos tienen continuidad de generación en generación, pero no los genotipos portadores. La constitución genética de una población referida a los alelos se describe por el conjunto de frecuencias alélicas es decir por la especificación de los alelos presentes en cada *locus* y el número o proporción de los diferentes alelos en cada *locus* (Falconer y Mackay 1996).

El equilibrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) se basa en la ausencia de cualquier fuerza evolutiva que altere la frecuencia alélica y genotípica en una población, siempre y cuando el organismo en consideración:

- Sea diploide, y el carácter en consideración no esté en un cromosoma que tiene un número distinto de copias en cada sexo (como el cromosoma X en humanos).
- Se reproduzca sexualmente.
- Tenga generaciones discretas.

Además, la población en consideración está idealizada, mantiene un apareamiento aleatorio entre los individuos que la conforman y tiene un tamaño infinito (o bastante grande para minimizar el efecto de la deriva genética) y no experimente selección, mutación y/o migración (flujo génético) (Hartl y Clark, 1989).

Las desviaciones del EHW pueden producirse debido a varios factores: apareamientos no aleatorios; existen subdivisiones dentro de la población (principio de Wahlund); coancestros o antepasados comunes; selección natural (ventaja de los heterocigotos); migración o flujo génico desde una población externa; técnicas de muestreo incorrecta o presencia de alelos nulos no detectables experimentalmente.

En un estudio sobre variación genética debe determinarse si hay desviaciones significativas del EHW en los *loci* estudiados. Si la proporción de genotipos para un solo *locus* no está en EHW, se puede atribuir a la existencia de alelos nulos o selección, pero si son varios *loci* independientes los que se desvían significativamente del EHW, este fenómeno puede deberse a que dentro de la población existen subdivisiones, migración o flujo génico desde una fuente externa o se están produciendo apareamientos no aleatorios (Bjorklund 2005).

La diferencia entre la heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada calculada a partir de las frecuencias alélicas, bajo la presunción de EHW, puede usarse como un método elemental para detectar desequilibrios en la estructura de una población. Cualquier desviación significativa indicará que la población está subdividida, que existe consanguinidad o un flujo génico de otra población. Estas circunstancias pueden ser estudiadas usando *tests* exactos o procedimientos de proporción de verosimilitud. Estos análisis son necesarios debido al gran número de alelos de los microsatélites y al elevado número de posibles genotipos.

II.8. Pruebas para calcular la desviación del Equilibrio de *Hardy Weinberg*

Una forma clásica de comprobar la existencia de desviaciones del EHW consiste en la comparación de los genotipos observados con los esperados dentro de una muestra. Este sistema es adecuado para polimorfismos que se caracterizan por tener pocos alelos,

como es el caso de las proteínas. Pero en el caso de los microsatélites, que poseen gran número de alelos, el número de genotipos es tan elevado que algunas frecuencias genotípicas son cero, sobre todo cuando las frecuencias alélicas son muy bajas. Este fenómeno es una de las limitaciones de la prueba χ^2 (chi-cuadrado) para probar el equilibrio y aunque la base para medir el equilibrio sigue siendo la prueba de χ^2 , se han desarrollado algunos algoritmos que tratan de ser más precisos cuando se utilizan genotipos multilocus muy grandes (Wellek, 2004). En estas circunstancias se utilizan *tests* exactos o procedimientos de proporción de verosimilitud mediante aplicaciones informáticas que realizan la importante cantidad de cálculos que las probabilidades exactas requieren.

II.9. Heterocigosis

Se acepta generalmente que un locus es polimórfico cuando el alelo más común tiene una frecuencia inferior a 0.95. Una medida de la variación genética es la proporción de loci polimórficos, o simplemente polimorfismo, en una población. No obstante, debido a que no siempre se utiliza el mismo criterio de polimorfismo, una mejor valoración de la variación genética es la heterocigosidad de la población medida como la frecuencia de individuos heterocigotos por locus. Los términos heterocigosidad y diversidad genética suelen usarse indiscriminadamente en la bibliografía. Generalmente se usa el término heterocigosidad para referirse a la heterocigosidad observada (H_o), y el de diversidad genética para referirse a la heterocigosidad esperada (H_e).

II.9.1. Heterocigosidad Observada (H_o)

Es la proporción de individuos heterocigotos observada en una muestra de la población. Si se calcula directamente a partir de los genotipos encontrados en la población para

todos los loci, se trata de la heterocigosidad media observada. La H_o se calcula por recuento directo.

II.9.2. Heterocigosidad Esperada o Diversidad Genética (H_e)

La H_e desde el punto de vista matemático, es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes (Crow y Kimura 1970). En una población en EHW, la frecuencia de heterocigotos viene dada por la ecuación $2pq$. Se calcula como: (Nei 1973)

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

x_i : frecuencia de alelo i y k : número de alelos

Este estadístico es equivalente a la heterocigosidad observada (H_o) cuando las poblaciones están en EHW.

II.10. Índices de Fijación o Estadísticos F

La teoría de los índices de fijación o estadísticos F fue concebida inicialmente por Sewall Wright (1951) y posteriormente desarrollada por otros autores (Chakraborty y Danker-Hopfe 1991). Wright propone medir las desviaciones de frecuencias genotípicas en poblaciones subdivididas por medio de tres parámetros: F_{is} , F_{it} y F_{st} .

El índice de fijación F_{is} (Wright, 1951) corresponde a la correlación existente en la unión de dos gametos al azar en relación a la subpoblación, cuyos valores explican las variaciones de la heterocigosidad debido a apareamientos no aleatorios en la subpoblación y a posibles efectos selectivos. El valor de F_{is} mide el déficit de heterocigotos presentes al interior de una población. El coeficiente de correlación de este

índice varía entre -1 (población compuesta por heterocigotos) y 1 (población compuesta de homocigotos).

El cálculo del estadístico F_{st} (coeficiente de diferenciación genética) permite determinar las diferencias genéticas entre localidades, en donde los valores de F_{st} igual a 0 indican que no hay diferenciación genética entre estas, mientras que valores significativamente diferentes a cero son un indicativo de estructuración genética de la población.

II.11. Avances en el estudio de la estructura poblacional de anchoveta

Pauly, D y I. Tsukayama (1987), determinaron que en el litoral peruano existen dos áreas desde el punto de vista pesquero en relación a la concentración del recurso y de los afloramientos: la zona “Norte-Centro” y la zona “Sur”, esta última con menor concentración. De la misma manera, los resultados publicados por Mendo (1991) utilizando isoenzimas apoyan la hipótesis tradicional de la existencia de dos stocks genéticos distintos a lo largo de la costa peruana.

El único aporte de información obtenido hasta la fecha en cuanto al análisis basado en DNA sobre el recurso anchoveta se ha desarrollado en Chile, por Ferrada *et al.* (2002), el cual realizó un estudio poblacional de este recurso hidrobiológico mediante el análisis de variabilidad de 2 genes nucleares, el intrón 4/5 del gen de Calmodulina (CaM) por amplificación por PCR y la región ITS (*Internal Transcribed Spacers*) del DNAr, por PCR y digestión en 139 ejemplares de *E. ringens* provenientes de las costas chilenas de Iquique (20°13'S; 70°09'W) y Talcahuano (36°41'S; 73°06'W). Los resultados de esta investigación confirman la existencia de un solo stock, desde el punto de vista genético en el mar chileno.

Por lo descrito anteriormente, existe una clara necesidad de realizar este tipo de estudio en el recurso anchoveta peruana (*E. ringens*) en nuestro país para poder contar con marcadores genéticos que generen información que nos ayude a realizar una gestión adecuada de este recurso.

III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

III.1 Hipótesis

- Los marcadores ILPs (basados en el polimorfismo de longitud de intrón) y STRs (microsatélites), obtenidos por la técnica EPIC-PCR y la estrategia de amplificación cruzada respectivamente, son informativos para el estudio de la diversidad genética de la anchoveta peruana *E. ringens*.

III.2 Objetivos

III.2.1 Objetivo General

- Evaluar la utilidad de los marcadores ILPs y STRs para estudios de diversidad genética y estructura poblacional del recurso anchoveta peruana (*E. ringens*) en el litoral peruano.

III.2.2 Objetivos Específicos

- Extraer DNA de buena calidad, mediante el método TNES-urea usando diferentes tipos de tejido, para las reacciones de amplificación por PCR de los ILPs y STRs.
- Estandarizar la amplificación por PCR de los marcadores ILPs y STRs en la anchoveta peruana (*E. ringens*), utilizando *primers* reportados previamente en la literatura.
- Caracterización de los loci ILPs y STRs en la anchoveta peruana (*E. ringens*).

IV. MATERIALES Y METODOS

IV. 1. Material biológico

La colecta de individuos se realizó a bordo de cruceros de investigación del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), con la excepción de la captura “C” que se colectó en el Terminal Pesquero del Callao. Se trabajó con muestras de tejido hepático, gonadal, branquial y muscular de la especie en estudio, estas fueron conservadas en alcohol etílico al 96° para la extracción de DNA.

Tabla 2. Información de las capturas de *E. ringens* realizadas por IMARPE.

Captura	N° individuos	Área de Colecta	Fecha de		Stock
			Colecta	Estación	
“3P”	43	Salaverry 08°31.30 S 79°30.41 S	Diciembre 2009	Verano	Norte
“82”	20	Callao 12°37.1 S 76°43 O	Marzo 2007	Verano	Centro
“C”	39	Callao 30 millas paralelas al	Marzo 2009	Verano	
“1”	29	Barranca-Supe 10°48.6 / 77°57.9	Agosto 2008	Invierno	
“8C”	34	Huacho 11°23.70 S 77°32.44 O	Diciembre 2009	Verano	
“103”	20	Pisco 15°11.4 S 75°25 O	Marzo 2007	Verano	
“124”	20	Ilo 17°15.2 S 72°02 O	Marzo 2007	Verano	Sur

N°: número.

El muestreo de individuos fue realizado al azar. Por las dificultades técnicas y económicas de procesar un gran número de muestras, se usó un número de 20-40 individuos por zona de colecta, los puntos de colecta se pueden observar en la Figura N° 6.

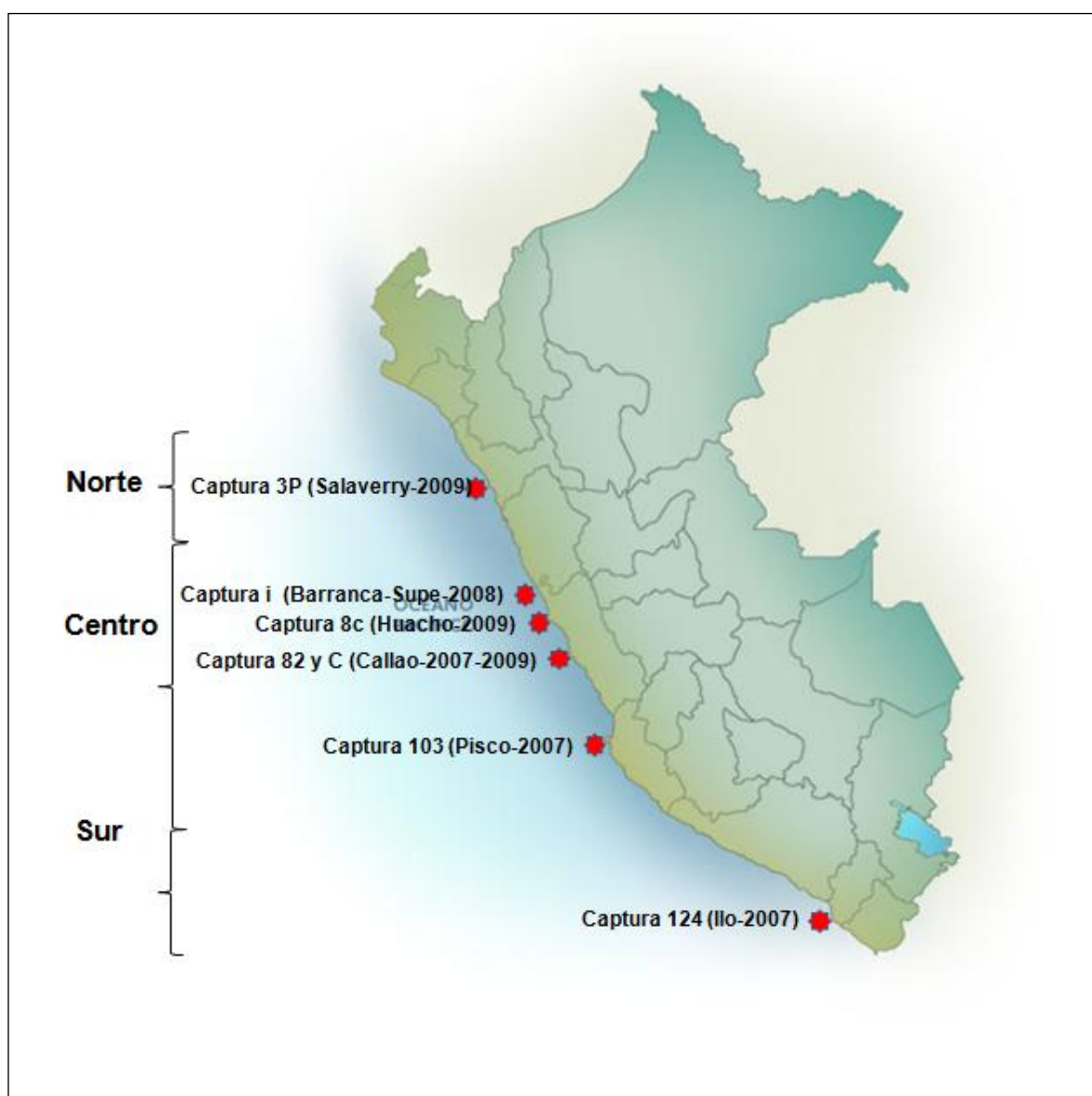


Figura 6. Localidades de muestreo de la anchoveta peruana analizadas en el presente estudio.

IV.2. METODOLOGÍA

IV.2.1 Extracción de ácidos nucleicos y visualización:

La extracción de DNA se realizó usando el protocolo de *Buffer* TNES-urea reportado por Asahida et al. (1996). Se extrajo 50 mg. de cada tejido, este fue previamente hidratado con 2 lavados de TE 20:1. En un tubo de 1.5 mL se agregó el tejido (aprox. 50 mg) más 600 uL de *buffer* TNES-urea (10 mM de Tris-HCl pH 8.0, 125 mM de NaCl, 10 mM de EDTA pH 8.0, 0.5% SDS, 4M de urea) y 10 uL de proteinasa K (20 mg/ml) incubándolo a 55°C por 12 horas. Pasado este tiempo de incubación se retiraron las muestras de la estufa y fueron centrifugadas a 12 000 rpm durante 10 minutos. En un tubo nuevo de 1.5 mL se agregó 200 uL del lisado centrifugado. Para la primera precipitación de los ácidos nucleicos se utilizó 80 uL de acetato de amonio (10M), se agitó por inversión, seguidamente se agregó 1000 uL de etanol absoluto frío agitando nuevamente por inversión. Las muestras luego fueron colocadas a -20°C por 1 hora, pasado este tiempo se retiraron y se centrifugaron a 12 000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante fue descartado y el pellet se puso a secar a temperatura ambiente, cuando este secó fue resuspendido en 100 uL de TE 10:1. Una segunda precipitación fue hecha con 5 uL de NaCL (5M) y etanol absoluto frío siguiendo los pasos posteriores de la primera precipitación. Para la resuspensión de los pellets se les agregó 200 uL de TE 10:1, agitando suavemente los tubos para lograr la completa disolución de los pellets.

El DNA obtenido fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Para la visualización de los ácidos nucleicos se utilizó un colorante fluorescente, bromuro de etidio. Este colorante tiene la propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas del DNA.

IV.2.2. Amplificación de los marcadores ILPs y STRs mediante PCR

La amplificación de los marcadores se realizó siguiendo las condiciones reportadas en la literatura: Landy *et al.*, (2005), en el caso de los microsatélites y Hassan *et al.*, (2002) para los ILPs (Tabla 3).

TABLA 3. Condiciones reportadas para la amplificación de marcadores ILPs y STRs en anchoveta peruana.

	Ee10/Ee2	Ck-7/Gh5
Reactivo	Conc. Final	Conc. Final
H2O	q.s.p.	q.s.p.
<i>Buffer</i>	1X (KCl)	1X (KCl)
<i>dNTPs</i>	0.2 mM	0.75 mM
MgCl ₂	2.5 mM	1.8 mM
Primer F	0.5 pmol	0.5 pmol
Primer R	0.5 pmol	0.5 pmol
Taq (Promega)	1 U	0.5 U
DNA	50 ng/ul	30-50 ng
Programa de PCR	94°C 3 min 94°C 30 seg *°C 60 seg } 35ciclos 72°C 30 seg } 72°C 3 min	95°C 3 min 94°C 12 seg **°C 12 seg } 35ciclos 72°C 20 seg } 72°C 5 min

q.s.p: quantity sufficient per, *: 54°C para Ee10 y 56°C para Ee2; **45-54°C para Ck-7 y 52-54°C para Gh-5. En el caso de las temperaturas de hibridación de los ILPs se colocó un rango de temperatura porque fueron probados en varias especies.

Además se modificaron las concentraciones de cloruro de magnesio y las temperaturas de hibridación para aumentar la astringencia de la reacción (Tabla 4). Estas pruebas fueron realizadas con 3-4 individuos. Estandarizada las condiciones de amplificación, se procedió a amplificar los marcadores en el resto de la población para determinar la

cantidad de alelos y heterocigosidad de los marcadores obtenidos. La reacción para la amplificación del marcador ILP Mlc-3 se encontraba estandarizada en el CGBM de la USMP por la Bach. en Ingeniería Biotecnológica Solange Paredes.

Para la amplificación se utilizó un termociclador BioRad DNA Engine ® Thermal Cycler con capacidad de 96 pocillos. Se utilizaron Kits de PCR de la marca Fermentas.

TABLA 4. Condiciones probadas para la amplificación de marcadores ILPs y STRs en anchoveta peruana.

Reactivo	Conc. Madre	Ck-7/Gh-5		Ee10/Ee2	
		Volumen (ul)	Conc. Final	Volumen (ul)	Conc. Final
H2O	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p
<i>Buffer</i>	10 X	1	1X (KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄)	2.5	1X (KCl)
<i>dNTPs</i>	10 mM	0.5	0.5 mM	0.5	0.5 mM
MgCl ₂	25 mM	0.6,0.8, 1	1.5,2,2.5 mM	1.5,2,2.5	1.5,2,2.5 mM
Primer F	10 pmol/ul	0.3, 0.2	0.3, 0.2 pmol	1.25	0.5 pmol
Primer R	10 pmol/ul	0.3, 0.2	0.3, 0.2 pmol	1.25	0.5 pmol
Taq	5 U/ul	0.1	0.05 U	0.1	0.05 U
DNA	30-50 ng	1	3-5 ng	1	3-5 ng
Volumen Rx Final		10ul		25ul	
Programa de PCR		4°C 3 min 95°C 3 min 94°C 12 seg 50,55,60°C 12 seg 72°C 20 seg 72°C 5 min 4°C 2 min		4°C 3 min 94°C 3 min 94°C 30 seg 54, 60°C 60 seg 72°C 30 seg 72°C 3 min 4°C 2 min	

q.s.p: quantity sufficient per.

Los marcadores moleculares fueron seleccionados de la literatura científica; en la siguiente tabla (Tabla 5) se detallan las características:

Tabla 5. Características de los marcadores empleados en el presente trabajo.

Tipo de Marcador	Gen	Intrón	Abreviación	Primers	Secuencia del Primers (5´-3´)	Referencia
ILPs	Creatina kinasa	Intron 7	Ck-7	CK6F CK7R	AAGAGGGTCTTTGACAGGTTCTGC TTCTCCTGGATCAGACGCTCCACC	Hassan <i>et al.</i> 2002.
	Hormona del Crecimeinto	Intron 5	Gh-5	Gh5F Gh6R	AGGCCAATCAGGACGGAGC TGCCACTGTCAGATAAGTCTCC	
	Cadena ligera de la miosina	Intron 3	Mlc-3	Mlc-3-F Mlc-3-R	AGTAATGACGTCGCAGATGTTCT CGACAGGTTCACTCTCGAGGAG	Touriya et al. 2003.
Locus		Motivo		Primers	Secuencia del Primers (5´-3´)	Referencia
STRs	Ee2	(CA)4GA(CA)12		Ee2-F Ee2-R	TCGCTAGGACGCTTTACGAC CCGGAGGTTTCAGTGTTCATT	Landi <i>et al.</i> 2005.
	Ee10	[(GT)9CT]2[(GT)2CT]3		Ee10-F Ee10-R	GGTGGATGAAGTGGCAATCT CTGGGGTGGCATAACTGAAG	

Tabla 6. Detalles de resultados reportados en la literatura utilizando los marcadores empleados en el presente trabajo

Intron		Especie	Individuos	N° de loci	Ta (°C)	Polimorfismo	N° alelos	He	Fis	Tamaño (pb)
Ck-7	<i>Siganus rivulatus</i> (Siganidae)	30	0	54	-	-	-	-	-	
	<i>Siganus luridus</i> (Siganidae)	30	0	54	-	-	-	-	-	
	<i>Thunnus obesus</i> (Scombridae)	100	1	45	Si	3	-	-	350	
	<i>Lates niloticus</i> (Centropomidae)	30	1	52	Si	-	-	-	-	
	<i>Chaetodon citrinellus</i> (Chaetodontidae)	50	Multilocus	54	-	-	-	-	-	
	<i>Chaetodon quadrimaculatus</i> (=)	50	Multilocus	54	-	-	-	-	-	
	<i>Forcipiger flavissimus</i> (=)	50	Multilocus	54	-	-	-	-	-	
Gh-5	<i>Siganus rivulatus</i>	137	1	52	No	-	-	-	350	
	<i>Siganus luridus</i>	126	1	52	Si	4	0.34	n.s.	350	
	<i>Thunnus obesus</i>	20	1	52	Si	2	-	-	-	
	<i>Lates niloticus</i>	30	Multilocus	52	Si	-	-	-	-	
	<i>Chaetodon citrinellus</i>	198	1	54	No	-	-	-	300	
	<i>Chaetodon quadrimaculatus</i>	233	1	54	No	-	-	-	300	
	<i>Forcipiger flavissimus</i>	234	1	54	-	-	-	-	-	
	<i>Dascyllus aruanus</i>	250	1	54	-	-	-	-	-	
	<i>Pomacentrus pavo</i>	167	1	54	Si	2	0.31	n.s.	300	
	<i>Plectroglyphidodon dickii</i>	79	2	54	No	-	-	-	300	
Mlc-3	<i>Sardina pilchardus</i>	3	1	54	Si	-	-	-	720	
	<i>Sardinops melanosticus</i>	3	1		-	-	-	-	-	
	<i>Engraulis encrasicolus</i>	3	1		Si	-	-	-	460	
	<i>Salmo marmorata</i>	2	1		No	-	-	-	100	
STR		Nombre de la especie		Ta(°C)/MgCl ₂ (mM)	Número de alelos	He/Ho	Tamaño (pb)			
Ee2	<i>Engraulis encrasicolus</i> (anchoveta Europea)	56/1.5 mM	25	0.88/0.58	210-284					
Ee10		54/1.5 mM	25	0.88/0.89	176-272					

IV.2.3 Visualización de los amplicones

Se emplearon 5 μ l del producto amplificado con el fin de visualizarlos en geles de agarosa al 2%. El gel fue coloreado con una solución de bromuro de etidio.

Una vez estandarizada la reacción de amplificación para cada marcador, estos fueron amplificados en un número mayor de individuos y visualizados en geles de acrilamida denaturantes al 5-6% para proceder a realizar la lectura de alelos. La corrida electroforética de los marcadores ILPs se realizó a 800 voltios (12 horas) en geles de acrilamida denaturantes al 5% de 20 cm x 40cm x1mm. En el caso de los STRs la corrida electroforética se realizó a 500V (2-3 horas) en geles de acrilamida denaturantes al 6% de 20 cm x 20 cm x 1mm y de 20 cm x 20 cm x 0.4 mm. Los geles fueron teñidos usando nitrato de plata.

Se procedió a leer los alelos de cada marcador en las poblaciones analizadas de la anchoveta peruana.

IV.2.4 Caracterización de los loci ILPs y STRs

IV.2.4.1 Diversidad genética

La variación poblacional de la especie se evaluó mediante los estimadores de diversidad genética expresados por el número de alelos por locus (N_a), heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o), el índice de fijación (F_{is}), riqueza alélica (AR) por locus y población, Estos fueron calculados con los programas Fstat versión 2.9.3.2 (Jerome Goudet, 2002) y Arlequín versión 3.11 (Laurent Excoffier, 2005). Los gráficos de las frecuencias alélicas por población fueron realizadas en la hoja de datos EXCEL.

IV.2.4.2. Índices de Fijación o Estadísticos F

El valor de Fis fue calculado usando el programa ARLEQUIN v. 3.11. De igual manera, se estimó la estructura genética a partir del índice de fijación Fst de manera pareada entre localidades usando el mismo programa.

IV.2.4.3. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Este fundamento de la genética poblacional fue analizado mediante una prueba exacta análoga a la prueba de Fisher en el programa ARLEQUIN v.3.11.

IV.2.4.4. Variación genética interpoblacional de *E. ringens*

Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) mediante el programa ARLEQUIN v.3, en donde se agruparon las poblaciones pertenecientes al stock norte (captura “3p”), las del stock centro (captura “8c”, “c”, “i”, “82” y “103”) y la del sur (captura “124”).

IV.2.4.5. Incidencia de alelos nulos

La probabilidad de existencia de alelos nulos se estimó mediante el programa CERVUS versión 3.0.3 (Tristan Marshall, 2006), este programa estima la frecuencias de posibles alelos nulos a partir de un algoritmo propuesto por Summers y Amos (1997) que tiene en cuenta las diferencias entre las frecuencias observadas y esperadas de los homocigotos.

V. RESULTADOS

V.1. Extracción de ácidos nucleicos (DNA)

El protocolo TNES-urea permitió aislar DNA a partir de los diferentes tipos de tejidos (muscular, gonadal, branquial y escamas) (Figura 7). El DNA obtenido de las muestras de músculo se encuentra íntegro, sin signos de degradación o fragmentación y con un promedio de 150 ng/ul (Figura 8), estas fueron las razones por la cual se optó por usar este tejido para extraer los DNAs que se utilizaron en el presente estudio. Los DNAs fueron almacenadas a 4°C luego de preparar las diluciones de trabajo de 1:3 con TE 10:1.

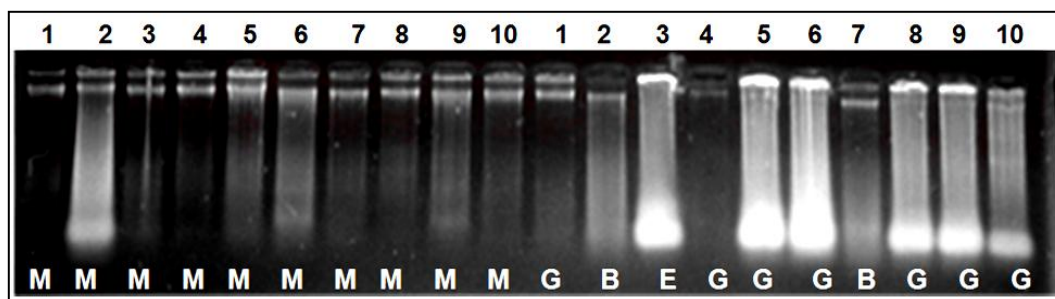


Figura 7. Corrida electroforética del DNA procedente de diferentes tejidos de anchoveta peruana, en gel de agarosa al 1.5%. M: músculo, G: gónada, E: escama, B: branquias.

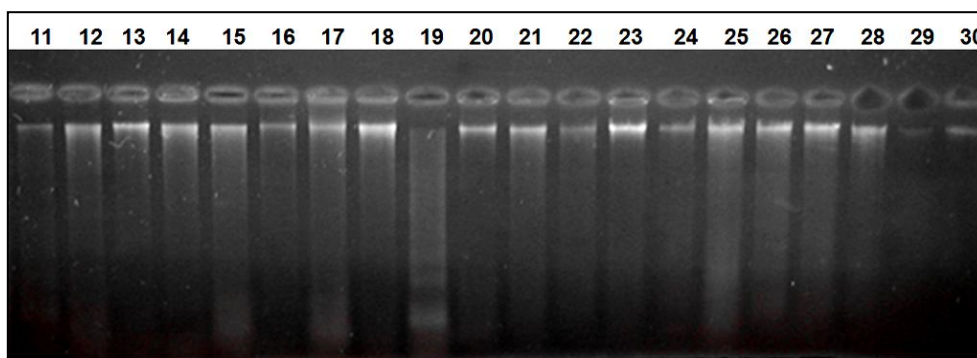


Figura 8. Corrida electroforética del DNA procedente del músculo de anchoveta peruana, en gel de agarosa al 1.5%.

V.2. Estandarización de la técnica de PCR para la amplificación de los ILPs y STRs de anchoveta peruana *E. ringens*.

A fin de determinar la concentración óptima de reactivos para la obtención de una amplificación adecuada del producto, fue necesario realizar varias experiencias. Se inició con la concentración de reactivos propuestos por los autores que reportaron los marcadores ILPs y STRs. Debido a que la amplificación no se logró, en algunos casos, bajo estas condiciones, fue necesario modificar las temperaturas y los tiempos en el termociclador, así como la realización de varias concentraciones de $MgCl_2$. Las distintas condiciones ensayadas en cuanto a concentraciones de reactivos se aprecian en la Tabla N°4 y algunos resultados en las Figuras N° 9, 10, 11, 12 y 13.

Las variaciones con respecto al protocolo de amplificación fueron dirigidas a cambios en la temperatura de *annealing* de los *primers* con el fin de obtener el acoplamiento adecuado a la secuencia blanco, así como la polimerización óptima del DNA.

De los 2 ILPs amplificados, Gh-5 no amplificó bajo las condiciones probadas. Se estableció el perfil de amplificación teniendo en cuenta la nitidez de la banda y la ausencia de productos inespecíficos.

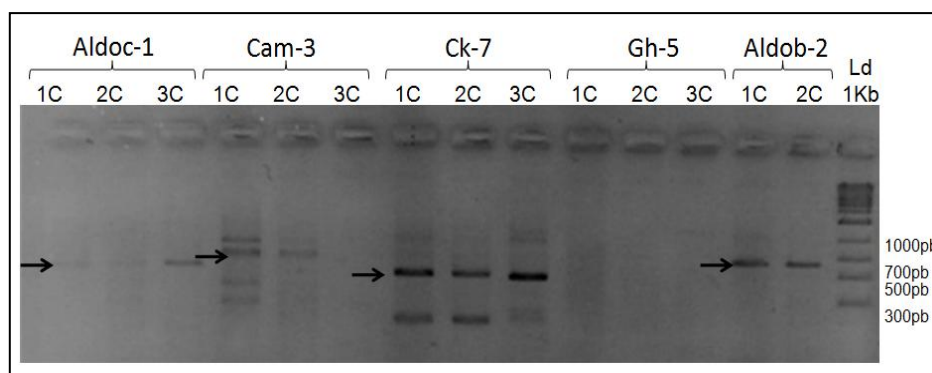


Figura 9. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5% de los amplicones a 55°C de temperatura de annealing, 2.5mM $MgCl_2$ y buffer KCl.

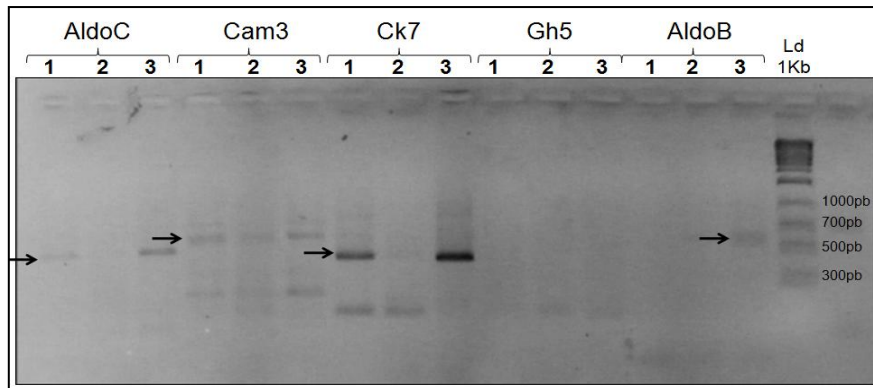


Figura 10. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5% de los amplicones a 55°C de temperatura de annealing, 2.5mM MgCl₂ y buffer (NH₄)₂SO₄.

La condición final escogida para la amplificación del marcador ILP Ck-7 se encuentra en la Tabla N° 7, al igual que la condición usada para la amplificación del marcador ILP Mlc-3. Los productos obtenidos luego de la modificación de las condiciones de amplificación pueden ser observados en la Figura N° 11. Los productos observados para el marcador Ck-7 y Mlc-3 se encuentran alrededor de las 500pb.

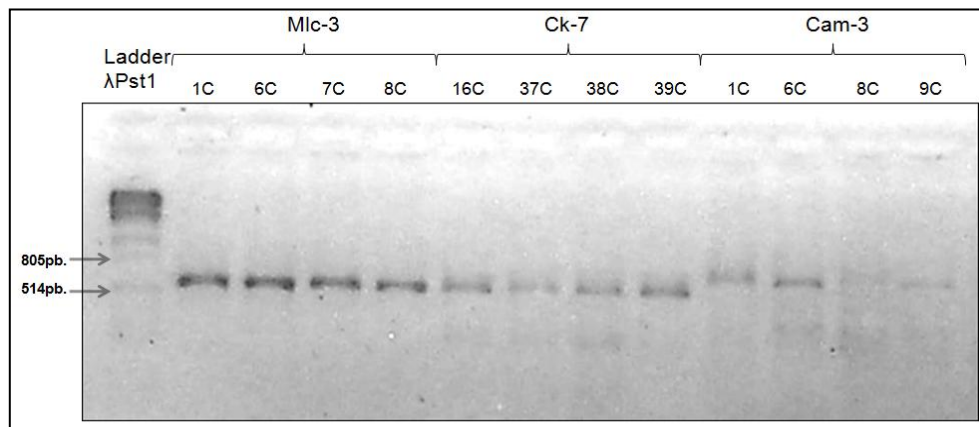


Figura 11. Corrida electroforética en gel de agarosa al 1.5% de los amplicones de los marcadores ILPs.

En el caso de los marcadores STRs Ee10 y Ee2, este último no amplificó bajo ninguna de las condiciones probadas en este trabajo. El marcador Ee10 amplificó bajo todas las condiciones ensayadas (Tablas N° 3 y 4).

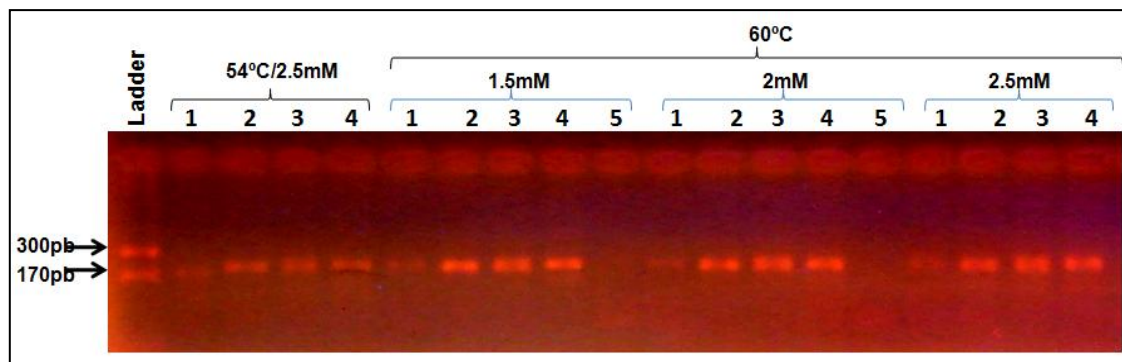


Figura 12. STR Ee10. Amplicones, a 54 y 60°C de temperatura de *annealing*, de ILPs, diferentes concentraciones de $MgCl_2$. Gel agarosa 2% 100V por 45 minutos. El carril 5 de cada prueba constituye el control negativo.

Los amplicones fueron analizados en un gel de acrilamida al 6% denaturante para detectar la presencia de bandas inespecíficas, en la Figura N°13 se puede observar que no existe diferencias en cuanto a la calidad del producto entre las condiciones probadas, razón por la cual se optó por elegir una condición intermedia de concentración de cloruro de magnesio (2 mM) y la temperatura de *annealing* más alta (60°C) para asegurar una alta astringencia de la reacción.

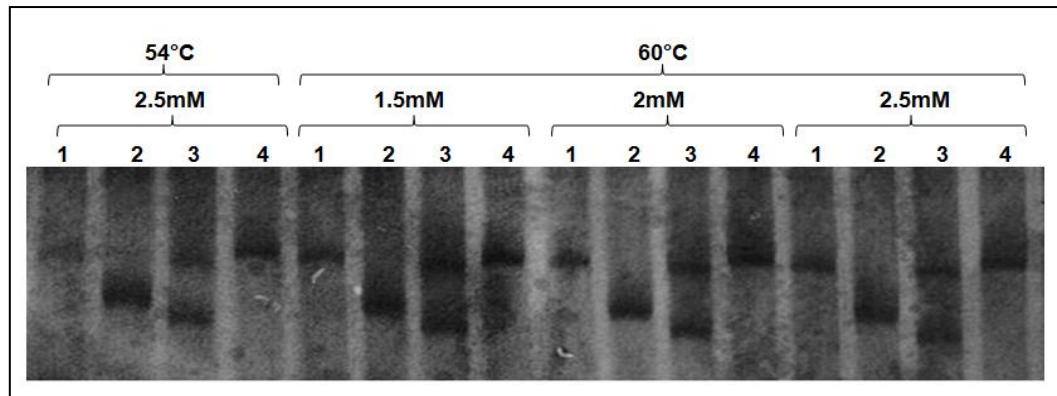


Figura 13. STR Ee10. Amplicones, a 54 y 60°C de temperatura de hibridación, de ILPs, diferentes concentraciones de MgCl₂. Gel de Acrilamida 5% denaturante, 500V por 2 horas.

Tabla 7. Condiciones finales para la amplificación de marcadores ILPs y STRs en anchoveta peruana

Reactivo	Conc. Madre	Mlc-3		Ck-7		Ee10	
		Volumen (ul)	Conc. Final	Volumen (ul)	Conc. Final	Volumen (ul)	Conc. Final
H2O	-	6	q.s.p	17.425	q.s.p	16.4	q.s.p
Buffer	10 X	1	1X (KCl)	2.5	1X (KCl)	2.5	1X (KCl)
dNTPs	10 mM	0.5	0.5 mM	1.875	0.75 mM	0.5	0.2 mM
MgCl ₂	25 mM	1	2.5 mM	1.5	1.5 mM	2	2 mM
PrimerF	10 pmol/ul	0.2	0.2 pmol	0.3	0.3 pmol	1.25	0.5 pmol
PrimerR	10 pmol/ul	0.2	0.2 pmol	0.3	0.3 pmol	1.25	0.5 pmol
Taq	5 U/ul	0.1	0.05 U	0.1	0.02 U	0.1	0.05 U
DNA	30-50 ng	1	3-5 ng	1	3-5 ng	1	3-5 ng
Volumen Rx Final		10ul		25ul		25ul	
PROGRAMA DE PCR		95°C 3 min 94°C 12 seg } 58°C 12 seg } 35 ciclos 72°C 20 seg } 72°C 5 min		94°C 3 min 94°C 12 seg } 50°C 12 seg } 35ciclos 72°C 20 seg } 72°C 5 min		94°C 3 min 94°C 30 seg } 60°C 60 seg } 35ciclos 72°C 30 seg } 72°C 3 min	
Longitud de producto		~500 pb		~500 pb		200-300 pb	

V.3. Amplificación, genotipaje y caracterización molecular de los loci ILPs y STRs

V.3.1 ILPs

V.3.1.1 Intrón 3 de la cadena ligera de la miosina (Mlc-3)

Un total de 60 individuos (correspondientes a las capturas “82”, “103” y “124”) fueron genotipados en el año 2008 por la Bach. en Ingeniería Biotecnológica Solange Paredes M. en el CGBM-USMP. Para la presente investigación se amplificaron y genotiparon 64 individuos más (correspondientes a las capturas “c” e “i”) (Figura 14).

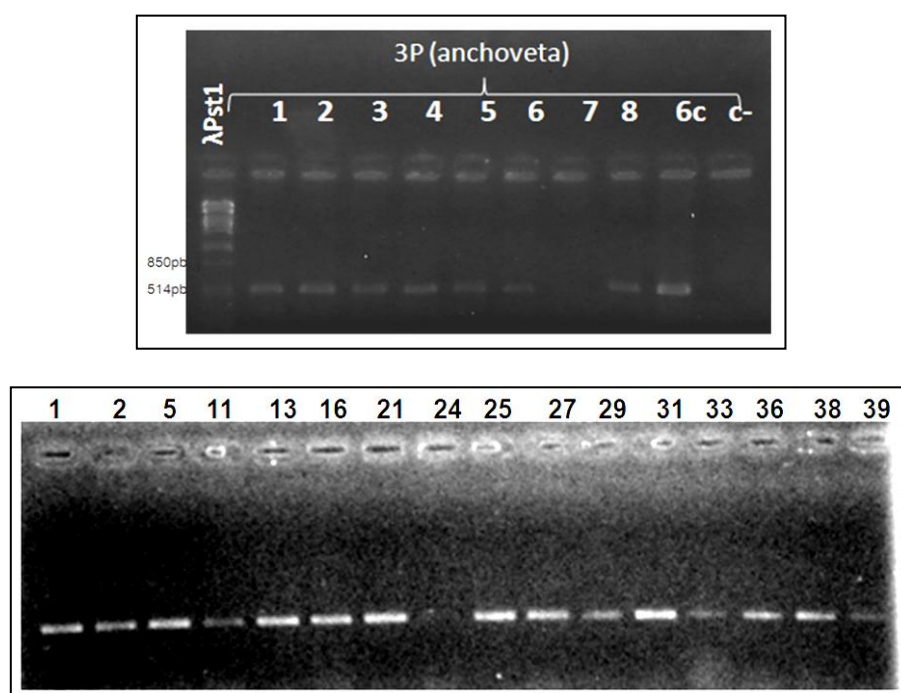


Figura 14. Amplicones de marcador ILP Mlc-3 en anchoveta peruana. Gel Agarosa 1.5%
100V/1 hora

Los amplicones fueron analizados en geles de acrilamida denaturantes al 5%. Se realizaron varias corridas electroforéticas en geles largos (20 x 40cm) debido al tamaño del producto, esto para separar al máximo los alelos y la lectura de estos sea lo más exacta posible.

Cada alelo, correspondiente a una banda amplificada, se registró con un número natural. Los genotipos homocigotos producen sólo una banda, en este caso son designados con el mismo número dos veces, por ejemplo: 0202 (Fig. N° 15), mientras que los genotipos heterocigotos producen dos bandas en la electroforesis, por ejemplo: 0203, 0206 (Carril 3 y 4 de la Fig. N° 16).

En las siguientes figuras se pueden observar algunos geles utilizados para la asignación de los alelos.

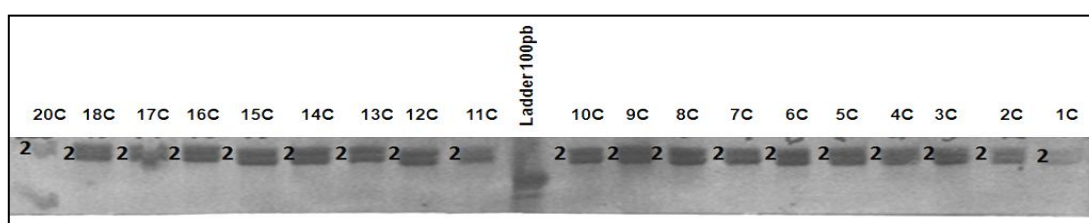


Figura 15. Electroforesis vertical en gel de acrilamida al 5% denaturante de amplicones Mlc-3 en anchoveta peruana, 800V /12 horas.

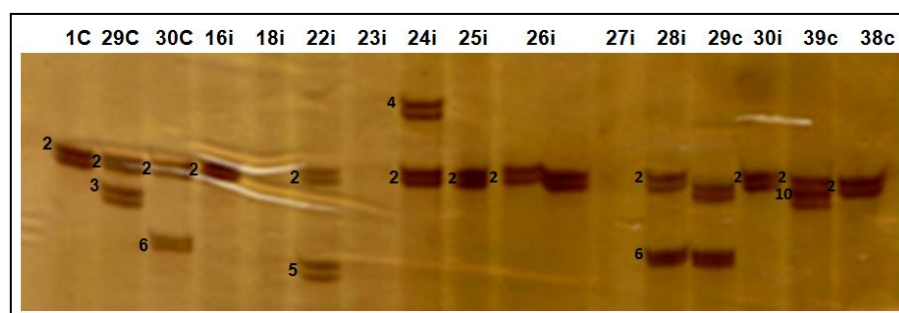


Figura 16. Electroforesis vertical en gel de acrilamida 5% denaturante de amplicones Mlc-3 en anchoveta peruana, 800V /12 horas.

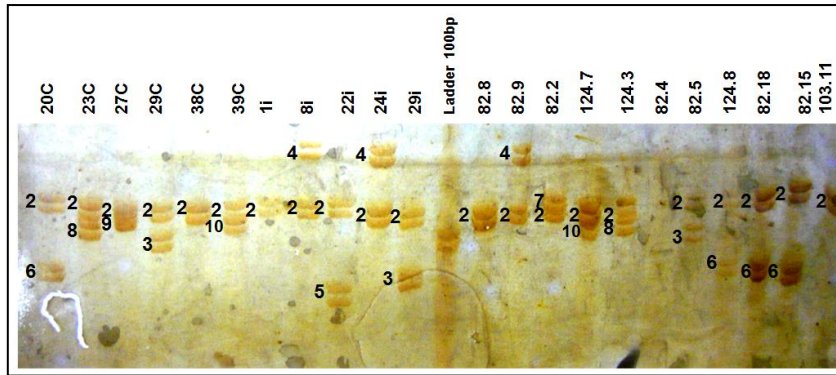


Figura 17. Alelos del marcador Mlc-3 en la población de anchoveta peruana analizada (n=128).

En la Figura 17 podemos observar los alelos registrados para el marcador Mlc-3, el alelo 1 es un producto de 300pb (no salió en la fotografía).

Los genotipos y alelos encontrados en toda la población (124 individuos) y en las cinco capturas para el marcador Mlc-3 se resumen en las siguientes tablas.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en anchoveta peruana

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0202	95	0.77
genotipo 2	0206	10	0.08
genotipo 3	0208	3	0.02
genotipo 4	0209	1	0.01
genotipo 5	0203	3	0.02
genotipo 6	0210	2	0.02
genotipo 7	0204	5	0.04
genotipo 8	0205	3	0.02
genotipo 9	0207	1	0.01
genotipo 10	0201	1	0.01
		124	1.00

Alelo	Frecuencia
01	0.004
02	0.883
03	0.012
04	0.020
05	0.012
06	0.040
07	0.004
08	0.012
09	0.004
10	0.008
TOTAL	1

El genotipo más frecuente para el marcador Mlc-3 en la población en general (sin considerar capturas), es el genotipo 1 (homocigoto para el alelo 2: 0202); de los 124 individuos analizados el 77% cuenta con este genotipo. Los heterocigotos están constituidos por el alelo 2 y otro diferente. Lo que indica que este alelo está presente de una manera predominante en la población.

Tabla 9. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc -3 en la captura “C”
(anchoveta peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0202	31	0.82
genotipo 2	0206	3	0.08
genotipo 3	0208	1	0.03
genotipo 4	0209	1	0.03
genotipo 5	0203	1	0.03
genotipo 6	0210	1	0.03
	TOTAL	38	1

Alelo	Frecuencia
02	0.908
03	0.013
06	0.039
08	0.013
09	0.013
10	0.013
TOTAL	1

Tabla 10. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en la captura “i”
(anchoveta peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0202	14	0.70
genotipo 2	0206	1	0.05
genotipo 3	0208	1	0.05
genotipo 5	0203	1	0.05
genotipo 7	0204	1	0.05
genotipo 8	0205	1	0.05
genotipo 9	0207	1	0.05
	TOTAL	20	1

Alelo	Frecuencia
02	0.870
03	0.019
04	0.056
05	0.019
06	0.037
TOTAL	1

Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en la captura “82”
(anchoveta peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0202	20	0.74
genotipo 2	0206	2	0.07
genotipo 5	0203	1	0.04
genotipo 7	0204	3	0.11
genotipo 8	0205	1	0.04
	TOTAL	27	1

Alelo	Frecuencia
02	0.850
03	0.025
04	0.025
05	0.025
06	0.025
07	0.025
08	0.025
TOTAL	1

Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en la captura “103”
(anchoveta peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0202	11	0.58
genotipo 2	0206	4	0.21
genotipo 3	0208	1	0.05
genotipo 6	0210	1	0.05
genotipo 7	0204	1	0.05
genotipo 8	0205	1	0.05
	TOTAL	19	1

Alelo	Frecuencia
01	0.025
02	0.975
TOTAL	1

Tabla 13. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Mlc-3 en la captura “124”
(anchoveta peruana)

Genotipo	Alelos	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0202	19	0.95
genotipo 10	0201	1	0.05
	TOTAL	20	1

Alelo	Frecuencia
02	0.789
04	0.026
05	0.026
06	0.105
08	0.026
10	0.026
TOTAL	1

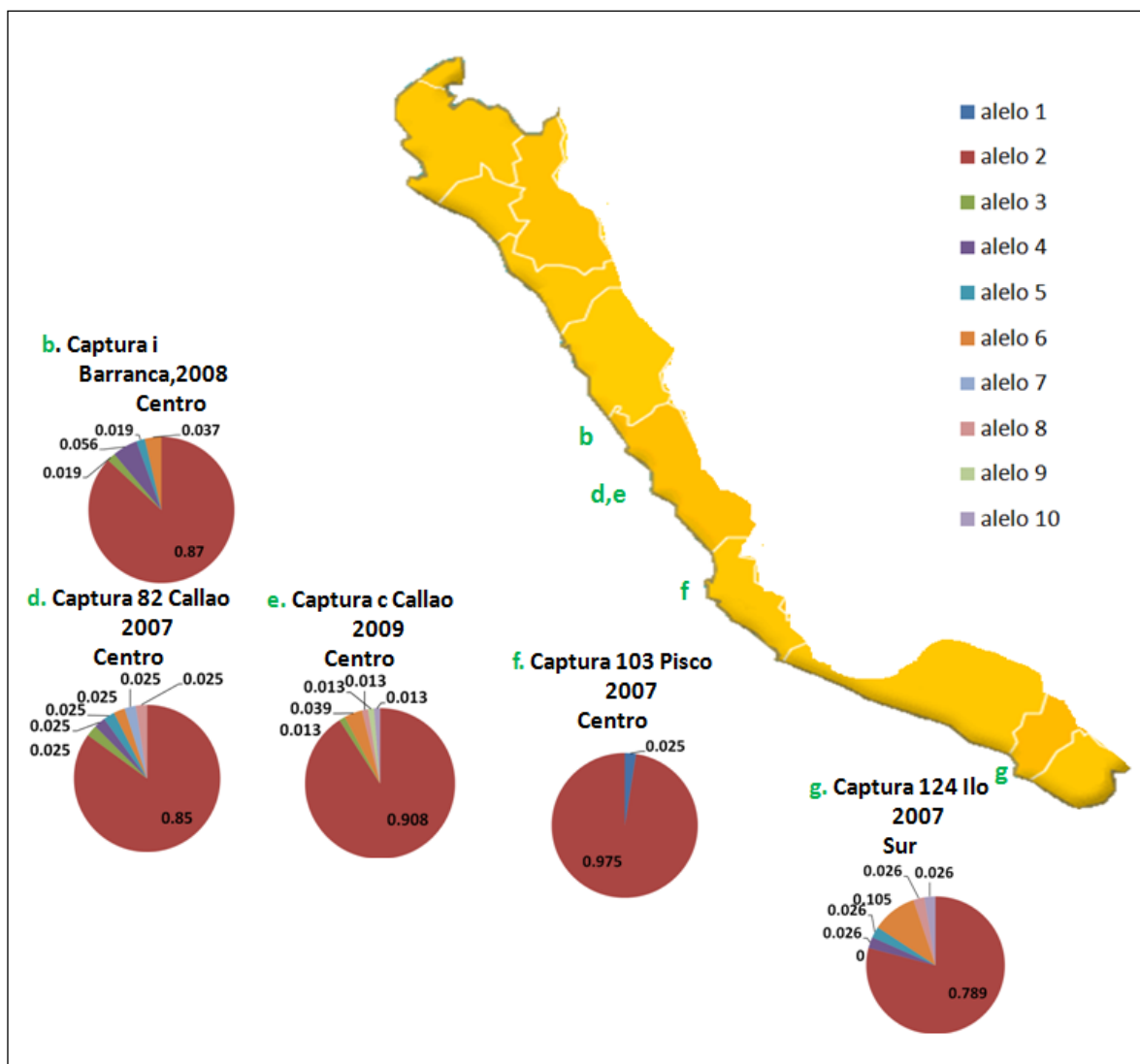


Figura 18. Distribución de frecuencias alélicas del marcador Mlc-3 en anchoveta peruana a lo largo del litoral peruano.

En la siguiente tabla se muestran los datos de la heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), F_{is} , y riqueza alélica de las 5 capturas evaluadas de anchoveta peruana.

Tabla 14. Caracterización del locus Mlc-3 de la anchoveta peruana.

Captura	(Ho)	(He)	Valor P	Fis	Nº Genotipos	Nº Alelos	Riqueza alélica
"C"	0.18421	0.17579	1.00	-0.049	6	6	3.880
"I"	0.25926	0.24179	1.00	-0.074	5	5	4.301
"82"	0.3000	0.28077	1.00	-0.070	7	7	6.700
"103"	0.05000	0.05000	1.00	0.000	2	2	1.950
"124"	0.42105	0.37269	1.00	-0.134	6	6	6.00
Promedio	0.243	0.224			10	10	4.310

Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada, Nº: número.

El promedio de las heterocigosidades observadas en el litoral peruano es de 0.243. Basándose en este valor, el marcador ILP Mlc-3 mostró un bajo grado de polimorfismo. Se encontraron 10 genotipos y 10 alelos en los 124 individuos evaluados. El alelo 2 se encontró en todas las capturas analizadas con una alta frecuencia (0.975-0.789), los alelos 9, 7 y 1 se encontraron exclusivamente en las capturas "C", "82" y "103" respectivamente, los demás alelos se compartieron en todas las capturas analizadas. El genotipo predominante fue el genotipo 1 (homocigoto para el alelo 2) en la población.

Los valores de Fis se encuentran cercanos a 0, y el valor P de las Ho y He es de 1, evidenciando que cada población se encuentra en EHW.

Debido al bajo grado de polimorfismo del marcador ILP Mlc-3 no se realizó el cálculo del valor de Fst ni del AMOVA.

V.3.1.2 Intrón 7 de la Creatina Quinasa (Ck-7)

Se amplificaron un total de 98 individuos con el ILP Ck-7.

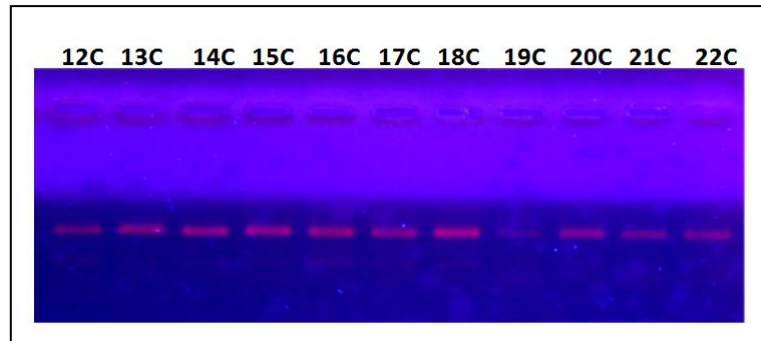


Figura 19. Electroforesis horizontal en gel de agarosa 1.5% (100V, 40 min) del marcador Ck-7 amplificado en anchoveta peruana.

Los amplicones fueron analizados en geles denaturantes de acrilamida al 5%. Para separar al máximo los alelos y que su lectura sea lo más exacta posible, se realizaron varias corridas en geles largos (20 x 40 cm). En la Figura N°20 se pueden observar algunos geles utilizados para la asignación de los alelos.

Cada alelo, correspondiente a una banda amplificada, se registró con un número natural. Los genotipos homocigotos producen sólo una banda, en este caso son designados con el mismo número dos veces, por ejemplo: 0303, mientras que los genotipos heterocigotos producen dos bandas en la electroforesis, por ejemplo: 0306, 0607.

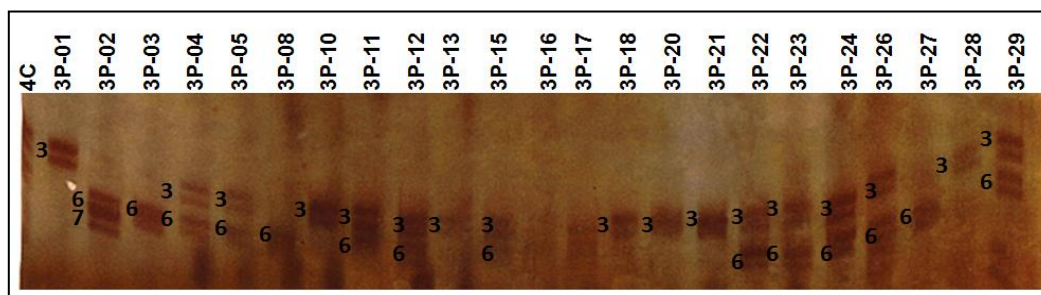
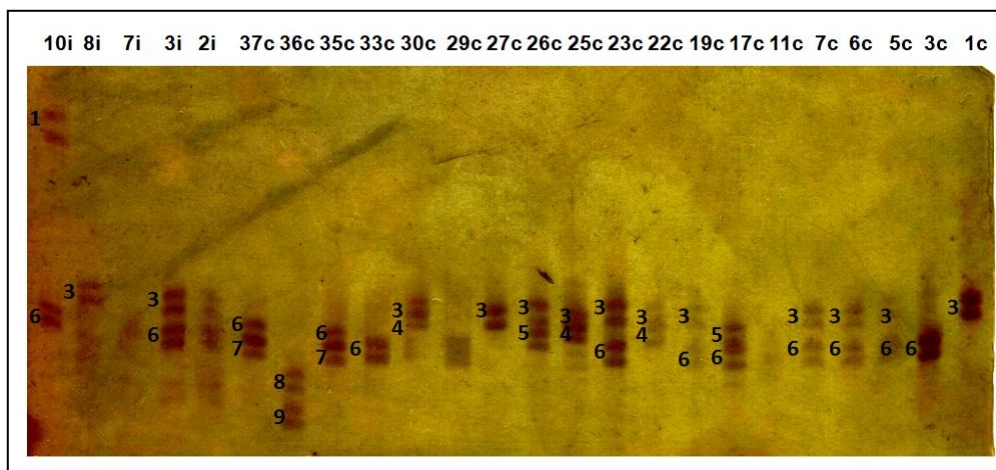
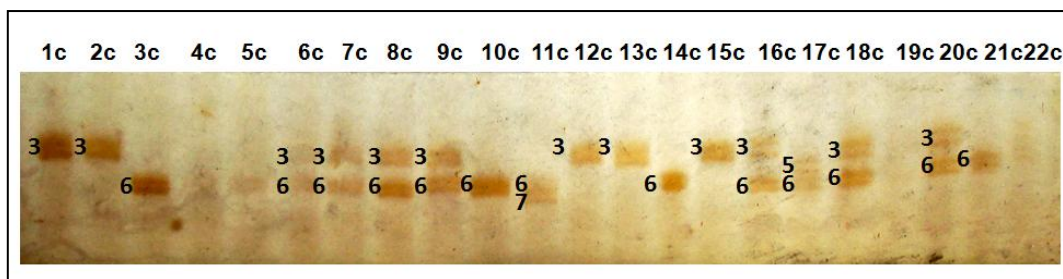


Figura 20. Electroforesis verticales en geles de acrilamida 5% denaturante (800V, 12 horas) del marcador Ck-7 amplificado en anchoveta peruana

Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ck-7 en anchoveta peruana

Nombre genotipo	Genotipo	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0303	25	0.26
genotipo 2	0606	13	0.13
genotipo 3	0306	38	0.39
genotipo 4	0607	9	0.09
genotipo 5	0506	1	0.01
genotipo 6	0305	2	0.02
genotipo 7	0304	3	0.03
genotipo 8	0308	1	0.01
genotipo 9	0809	2	0.02
genotipo 10	0608	1	0.01
genotipo 11	0106	2	0.02
genotipo 12	0206	1	0.01
TOTAL		98	1.00

Alelo	Frecuencia
01	0.010
02	0.005
03	0.480
04	0.015
05	0.015
06	0.398
07	0.046
08	0.020
09	0.010
TOTAL	1.00

El genotipo más frecuente para el marcador Ck-7 en la población, sin considerar capturas, es el genotipo 1 (homocigoto para el alelo 3), 3 (heterocigoto para 3 y 6) y el 2 (homocigoto para el alelo 6), de los 98 individuos analizados el 26%, 39% y 13% cuentan con este genotipo respectivamente.

Tabla 16. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ck-7 en la captura “C”
(anchoveta peruana)

Nombre genotipo	Genotipo	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0303	7	0.18
genotipo 2	0606	6	0.15
genotipo 3	0306	16	0.41
genotipo 4	0607	3	0.08
genotipo 5	0506	1	0.03
genotipo 6	0305	2	0.05
genotipo 7	0304	2	0.05
genotipo 8	0308	1	0.03
genotipo 9	0809	1	0.03
	TOTAL	39	1.00

Alelo	Frecuencia
03	0.449
04	0.026
05	0.038
06	0.410
07	0.038
08	0.026
09	0.013
TOTAL	1

Tabla 17. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ck-7 en la captura “i”
(anchoveta peruana)

Nombre genotipo	Genotipo	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0303	6	0.22
genotipo 2	0606	3	0.11
genotipo 3	0306	7	0.26
genotipo 4	0607	5	0.19
genotipo 7	0304	1	0.04
genotipo 9	0809	1	0.04
genotipo 10	0608	1	0.04
genotipo 11	0106	2	0.07
genotipo 12	0206	1	0.04
	TOTAL	27	1

Alelo	Frecuencia
01	0.037
02	0.019
03	0.370
04	0.019
06	0.407
07	0.016
TOTAL	1

Tabla 18. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ck-7 en la captura “3p”
(anchoveta peruana)

Nombre genotipo	Genotipo	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0303	12	0.38
genotipo 2	0606	4	0.13
genotipo 3	0306	15	0.47
genotipo 4	0607	1	0.03
	TOTAL	32	1

Alelo	Frecuencia
03	0.609
06	0.375
07	0.016
TOTAL	1

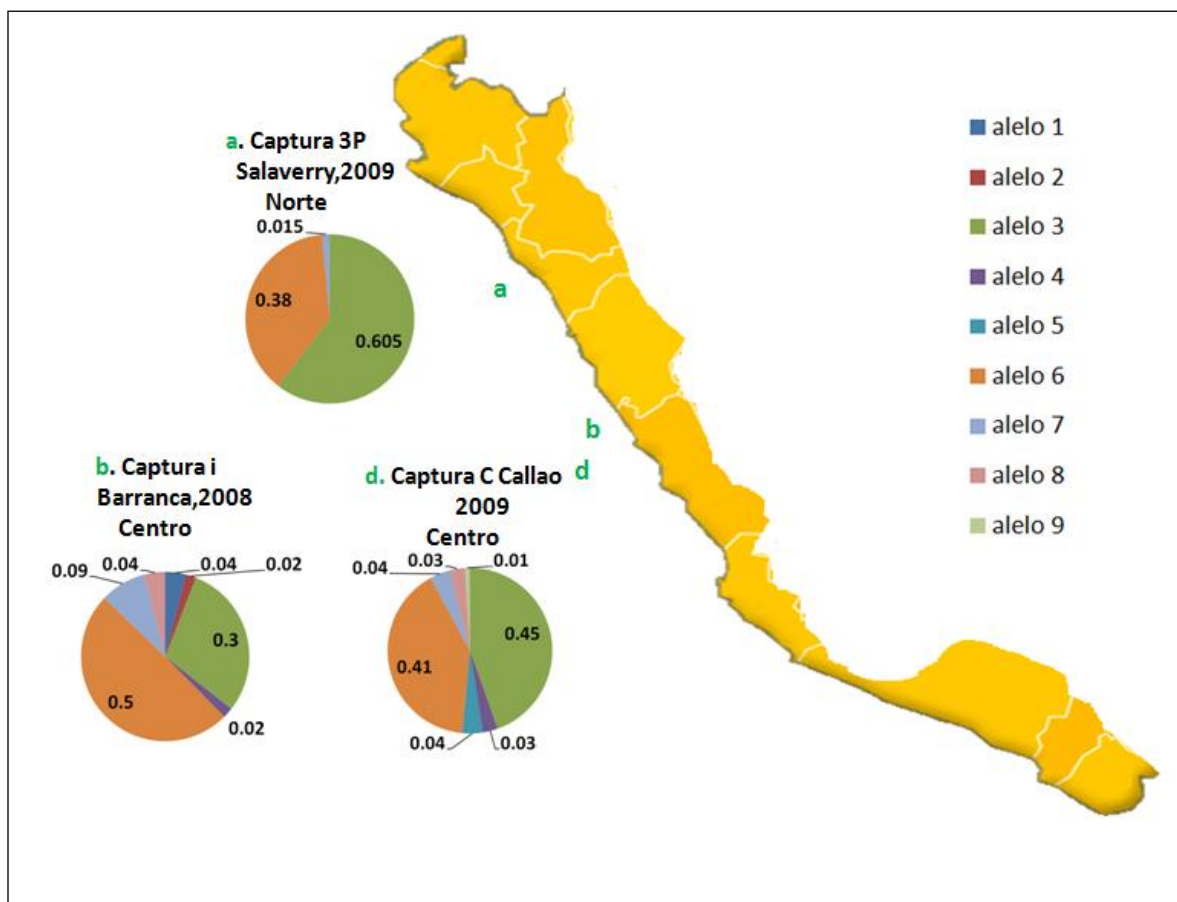


Figura 21. Distribución de la frecuencia alélica del ILP Ck-7 en la anchoveta peruana a lo largo del litoral peruano.

En la siguiente tabla se muestran los datos de H_o , H_e , F_{is} , riqueza alélica de las 3 capturas evaluadas de anchoveta peruana.

Tabla 19. Caracterización del locus Ck-7 de la anchoveta peruana.

Captura	(H_o)	(H_e)	P-valor	F_{is}	Nº Genotipos	Nº Alelos	Riqueza alélica
"C"	0.666	0.634	0.185	-0.052	9	7	8.00
"i"	0.666	0.697	0.09	0.045	9	6	6.455
"3p"	0.500	0.495	0.495	-0.009	4	3	2.844
PROMEDIO	0.611	0.608			12	9	6.148

H_o : heterocigosidad observada, H_e : heterocigosidad esperada, Nº: número.

El promedio de la heterocigosidad observada en el litoral peruana es de 0.611. El marcador ILP Ck-7 mostró un grado de polimorfismo más alto en comparación al marcador Mlc-3, teniendo como base el valor de la heterocigosidad observada. Se encontraron 12 genotipos y 9 alelos en los 98 individuos evaluados. Los alelos 03 y 06 se encontraron en todas las capturas analizadas con una frecuencia de 0.609-0.370 y 0.410-0.375 respectivamente. Los alelos 01 y 02 sólo se encontraron en la captura i. Los genotipos predominantes en todas las capturas fueron el 1 (0303), 2 (0606) y 3 (0306).

Los valores de F_{is} se encuentran cercanos a cero, y el P-valor de las H_o y H_e es mayor a 0.05, evidenciando que la población se encuentra en EHW.

El valor global de F_{st} (diferenciación genética entre poblaciones) es 0.0219 con un P-valor de 0.122+-0.0119, lo que indica que las capturas analizadas (pertenecientes al stock centro y sur) constituyen una misma población.

Tabla 20. Valores de Fst entre las diferentes capturas analizadas.

	Captura “C”	Captura “i”	Captura “3p”
Captura “C”	0.00000		
Captura “i”	-0.00625	0.00000	
Captura “3p”	0.001233	0.03907*	0.00000

* P-valor <0.05

Los valores de las comparaciones pareadas de Fst entre capturas se encuentran cercanos a cero (Tabla N° 20. Los P-valores son mayores a 0.05, es decir que no existe diferenciación genética entre las capturas analizadas, con excepción del valor P entre las capturas “3p” e “i” (0.04653+-0.0021), lo que evidencia diferencia genética entre estas dos capturas, pero esta no es suficiente para que constituyan dos poblaciones diferentes.

Aunque los valores pareados de Fst, no evidenciaron una diferencia genética entre capturas, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Tabla N°21) con el fin de determinar la variabilidad dentro y entre agrupaciones. Se realizaron dos agrupaciones siguiendo los siguientes criterios:

- Stock centro (captura “c”, “i”) vs. Stock Norte (“3p”)

Tabla 21. Análisis de varianza molecular entre los stock centro y sur en *E. ringens*

Variación	Varianza	% Variación total	Estadístico F	P-valores
Entre grupos (centro y norte)	0.00842	2.72	0.02190	0.09873+-0.00932
Entre poblaciones (“C”, “i” y “3p”)	-0.00163	-0.53	-0.00540	0.54839+-0.01535
Dentro de las poblaciones	0.30311	97.81	0.02716	0.32454+-0.01790

El análisis espacial (entre stock centro y norte) mediante la prueba de AMOVA determinó que existe una diferencia de 2.72% entre estos grupos pero esta no es significativa, las

diferencias entre las poblaciones analizadas es nula y dentro de las poblaciones constituye un 97.81%.

V.3.2. STRs

V.3.2.1 Ee10 (*E. encrasicolus* 10)

Se amplificaron un total de 168 individuos con el STR Ee10.

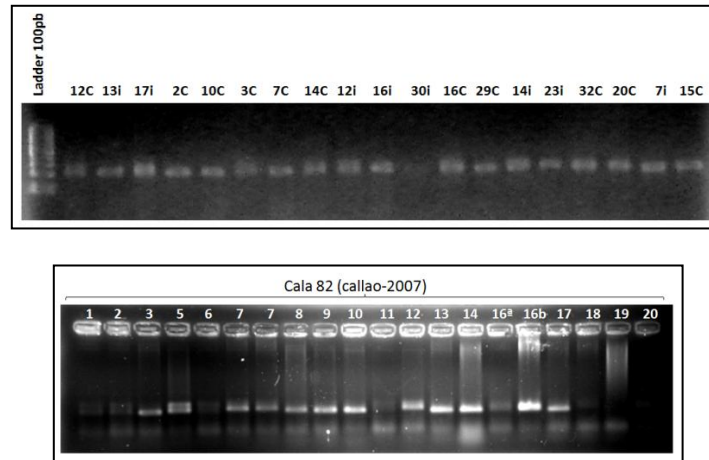


Figura 22. Electroforesis horizontal en geles de agarosa 1.5% (100V, 30min) del marcador STR Ee10 amplificado en anchoveta peruana.

Los amplicones fueron analizados en geles denaturantes de acrilamida al 6%. Se realizaron varias corridas electroforéticas en geles medianos de acrilamida (20 x 20cm) debido al tamaño del producto.

Cada alelo, correspondiente a una banda amplificada, se registró con un número natural. Los genotipos homocigotos producen sólo una banda, en este caso son designados con el mismo número dos veces, por ejemplo: 0606 (Fig. N° 23), mientras que los genotipos heterocigotos producen dos bandas en la electroforesis, por ejemplo: 0206, 0405 (Fig. N° 24).

En las Figuras N°23,24 y 25 se pueden observar algunos geles utilizados para la asignación de los alelos.

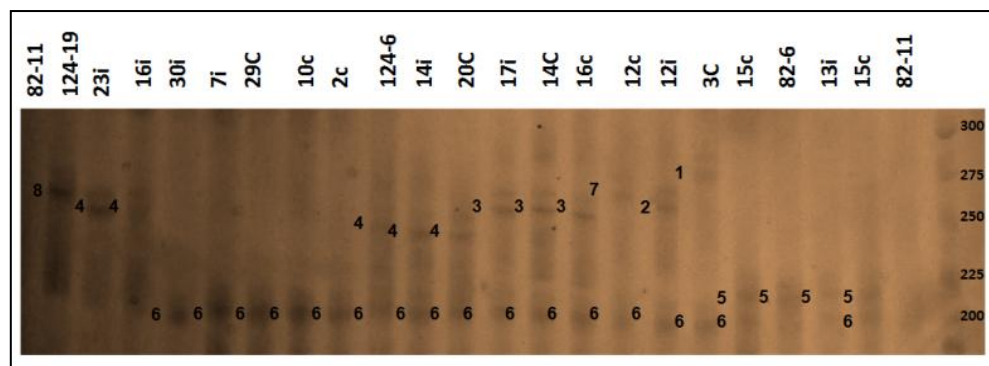
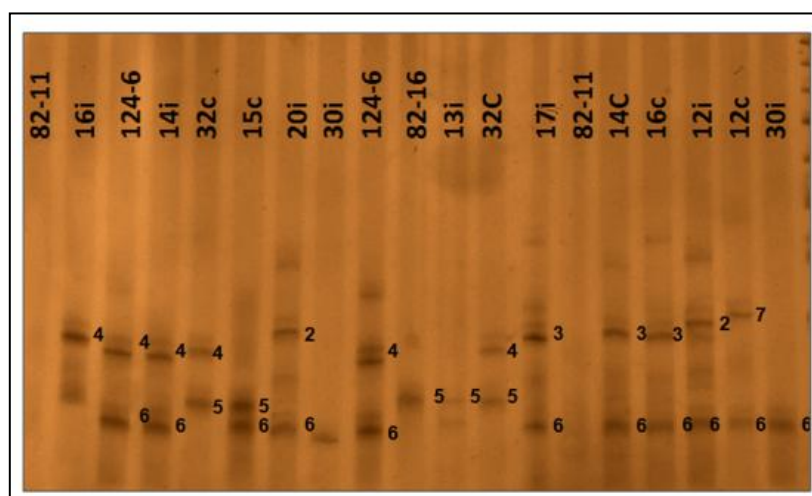
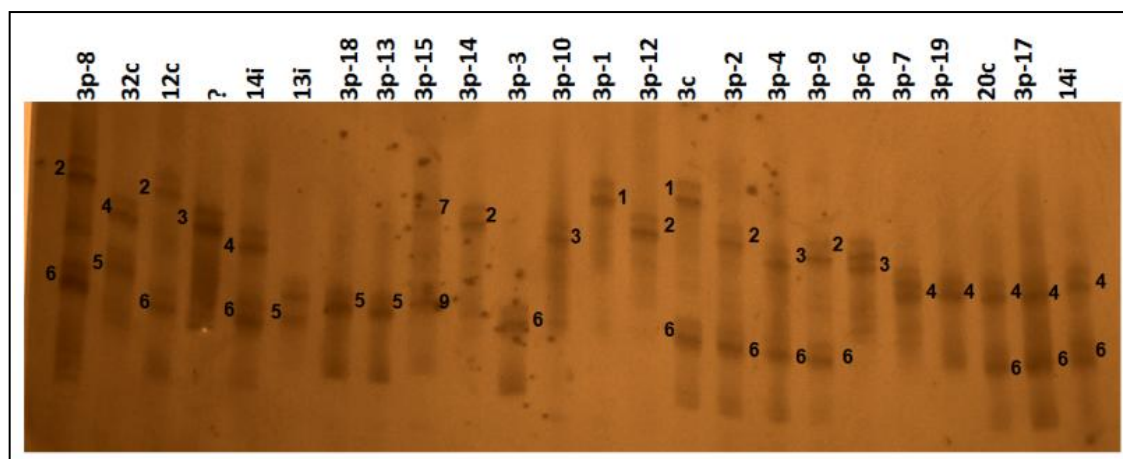
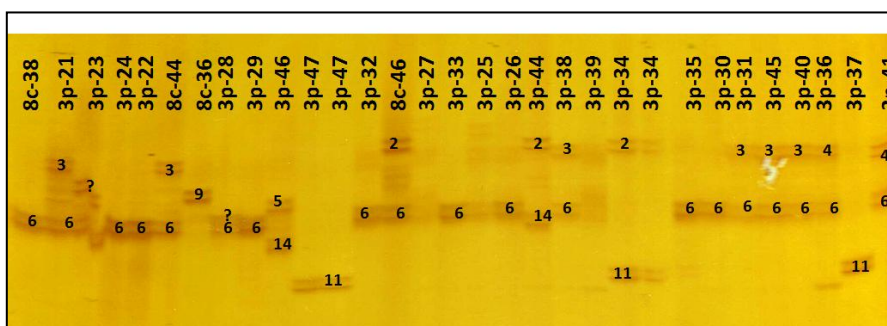
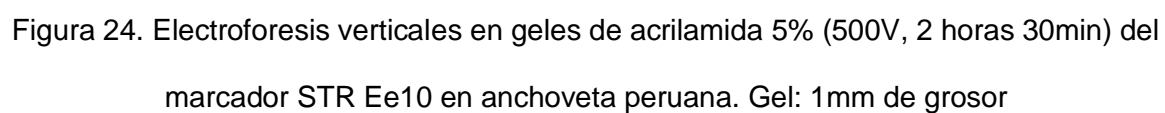


Figura 23. Electroforesis vertical en geles de acrilamida 5% (500V, 2 horas 30min) del marcador STR Ee10 en anchoveta peruana. Gel: 1mm de grosor.





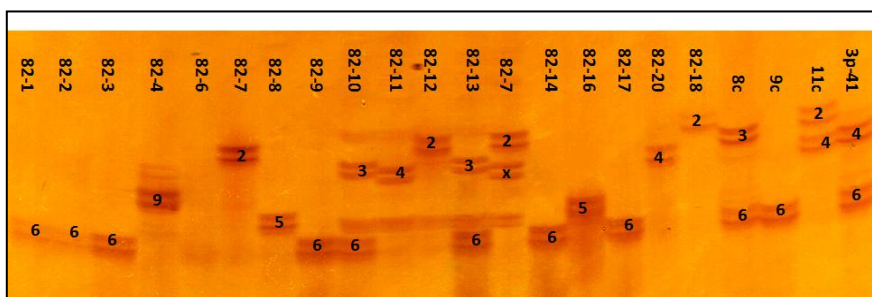
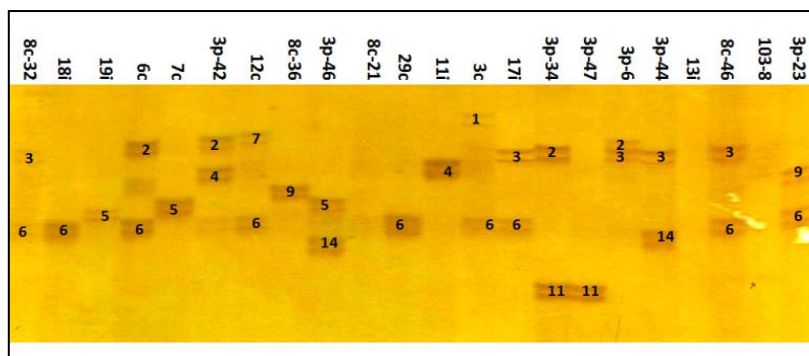


Figura 25. Electroforesis verticales en geles de acrilamida 5% (500V, 2 horas 30min) del marcador STR Ee10 en anchoveta peruana. Gel: 0.4mm de grosor

Los genotipos y alelos encontrados en las siete capturas se resumen en las siguientes tablas.

Tabla 22. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la captura “82”
(anchoveta peruana)

Nombre genotipo	Genotipo	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0606	6	0.33
genotipo 2	0909	1	0.06
genotipo 3	0505	4	0.22
genotipo 4	0202	3	0.17
genotipo 5	0306	2	0.11
genotipo 6	0404	2	0.11
	TOTAL	18	1

Alelo	Frecuencia
02	0.167
03	0.056
04	0.111
05	0.222
06	0.389
09	0.056
TOTAL	1

Tabla 23. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la captura “C”
(anchoveta peruana)

Nombre genotipo	Genotipo	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0606	6	0.29
genotipo 3	0505	1	0.05
genotipo 5	0306	5	0.24
genotipo 7	0406	2	0.1
genotipo 8	0706	1	0.05
genotipo 9	0106	1	0.05
genotipo 10	0506	1	0.05
genotipo 11	0405	1	0.05
genotipo 12	0204	1	0.05
genotipo 13	0206	2	0.1
	TOTAL	21	1

Alelo	Frecuencia
01	0.024
02	0.071
03	0.119
04	0.095
05	0.095
06	0.571
07	0.024
TOTAL	1

Tabla 24. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la captura “I”
(anchoveta peruana)

Nombre genotipo	Genotipo	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0606	4	0.21
genotipo 3	0505	2	0.11
genotipo 4	0202	3	0.16
genotipo 5	0306	1	0.05
genotipo 6	0404	3	0.16
genotipo 7	0406	2	0.11
genotipo 13	0206	2	0.11
genotipo 14	0303	1	0.05
genotipo 15	0707	1	0.05
	TOTAL	19	1

Alelo	Frecuencia
02	0.211
03	0.079
04	0.211
05	0.105
06	0.342
07	0.053
TOTAL	1

Tabla 25. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la captura “8C”
(anchoveta peruana)

Nombre genotipo	Genotipo	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0606	15	0.44
genotipo 2	0909	2	0.06
genotipo 3	0505	1	0.03
genotipo 4	0202	2	0.06
genotipo 5	0306	3	0.09
genotipo 7	0406	5	0.15
genotipo 13	0206	1	0.03
genotipo 14	0303	2	0.06
genotipo 16	0906	2	0.06
genotipo 17	1111	1	0.03
	TOTAL	34	1

Alelo	Frecuencia
02	0.074
03	0.103
04	0.074
05	0.029
06	0.603
09	0.088
11	0.029
TOTAL	1

Tabla 26. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la captura “3p”
(anchoveta peruana)

Nombre genotipo	Genotipo	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0606	11	0.26
genotipo 2	0909	1	0.02
genotipo 3	0505	2	0.05
genotipo 4	0202	2	0.05
genotipo 5	0306	8	0.19
genotipo 6	0404	2	0.05
genotipo 7	0406	2	0.05
genotipo 9	0101	1	0.02
genotipo 12	0204	1	0.02
genotipo 13	0206	4	0.09
genotipo 14	0303	2	0.05
genotipo 16	0906	1	0.02
genotipo 17	1111	2	0.05
genotipo 18	0705	1	0.02
genotipo 19	0211	1	0.02
genotipo 20	0314	1	0.02
genotipo 21	0514	1	0.02
	TOTAL	43	1

Alelo	Frecuencia
01	0.023
02	0.116
03	0.151
04	0.081
05	0.070
06	0.430
07	0.012
09	0.035
11	0.058
14	0.023
TOTAL	1

Tabla 27. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la captura “103”
(anchoveta peruana)

Nombre genotipo	Genotipo	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0606	4	0.24
genotipo 5	0306	3	0.18
genotipo 6	0404	6	0.35
genotipo 7	0406	1	0.06
genotipo 14	0303	1	0.06
genotipo 22	1206	1	0.06
genotipo 23	0305	1	0.06
	TOTAL	17	1

Alelo	Frecuencia
03	0.176
04	0.382
05	0.029
06	0.382
12	0.029
TOTAL	1

Tabla 28. Frecuencias genotípicas y alélicas para el marcador Ee10 en la captura “124”
(anchoveta peruana)

Nombre genotipo	Genotipo	Individuos	Frecuencia Genotípica
genotipo 1	0606	3	0.19
genotipo 4	0202	1	0.06
genotipo 6	0404	2	0.13
genotipo 7	0406	3	0.19
genotipo 8	0706	1	0.06
genotipo 11	0405	1	0.06
genotipo 14	0303	1	0.06
genotipo 15	0707	1	0.06
genotipo 24	0808	1	0.06
genotipo 25	0714	1	0.06
genotipo 26	0203	1	0.06
	TOTAL	16	1

Alelo	Frecuencia
02	0.094
03	0.094
04	0.250
05	0.031
06	0.313
07	0.125
08	0.063
14	0.031
TOTAL	1

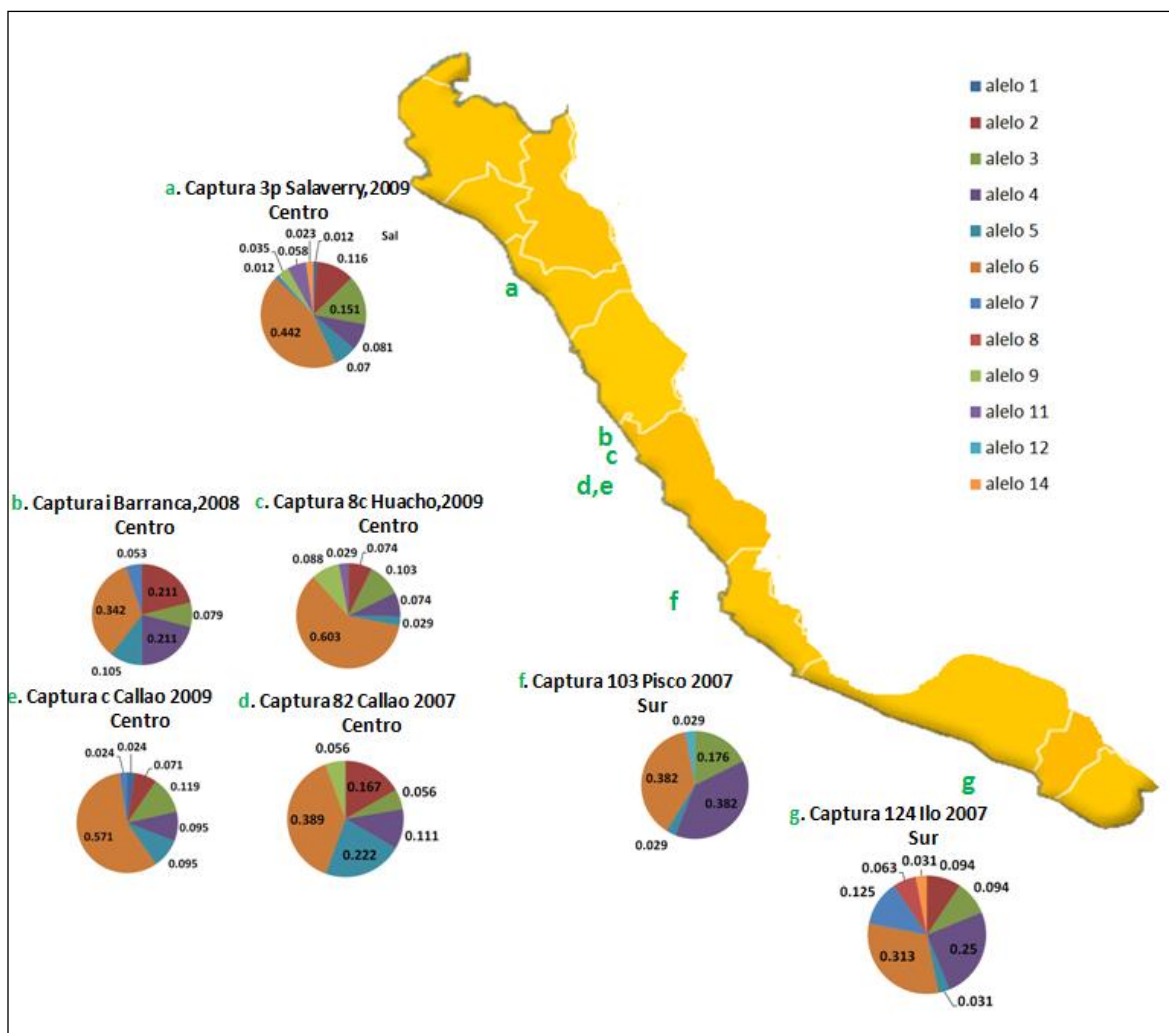


Fig 23. Distribución de la frecuencia alélica del STR Ee10 en la anchoveta peruana a lo largo del litoral peruano.

En la siguiente tabla se muestran los datos de H_o , H_e , F_{is} y riqueza alélica de las 7 capturas de anchoveta peruana evaluadas con el marcador Ck-7.

Tabla 29. Caracterización del locus Ee10 de anchoveta peruana.

Captura	(Ho)	(He)	P-valor	Fis	Nº Genotipos	Nº Alelos	Riqueza alélica
“82”	0.11111	0.77460	0.000	0.860	6	6	5.981
“C”	0.66667	0.65041	0.635	-0.026	10	7	6.509
“I”	0.26316	0.79516	0.00002	0.675	9	6	5.976
“8c”	0.32353	0.61457	0.0000	0.477	10	7	6.348
“3p”	0.48837	0.76033	0.0000	0.360	17	10	7.924
“103”	0.35294	0.69519	0.0022	0.500	7	5	4.882
“124”	0.43750	0.82661	0.00072	0.479	11	8	8.00
TOTAL		168 individuos			26	12	7.342

Ho: heterocigosidad observada, He: heterocigosidad esperada, Nº: número.

Al analizar las heterocigosidades se observó que la observada (Ho) fue mucho menor a la esperada (He) en todas las capturas analizadas, con excepción de la captura “C”, presentando una desviación en el EHW. Los valores de Fis se encuentran cercanos a 1, lo que indica un déficit de heterocigotos. El alelo predominante es el alelo 6, con una frecuencia de 0.603-0.313 en las capturas analizadas.

Debido a esta desviación tan significativa en el EHW no se realizó el cálculo de los valores de Fst y del AMOVA. Sin embargo, fue recomendable añadir el elemento “posibilidad de alelos nulos” como una de las posibles causas que se han aceptado en la literatura para justificar este tipo de hallazgo.

Todas las capturas, con excepción de la captura “C”, muestran estimados de frecuencias para alelos nulos de 0.2005-0.7420. La “posibilidad de alelos nulos” total fue de 0.3856, sin considerar la captura “C” (que se encontraba en EHW) y de 0.29 al considerarla. En general, los valores obtenidos son altos, lo cual sugiere que el déficit de heterocigotos se deba a alelos nulos del locus Ee10 y esto esté causando que la población no se encuentre en Equilibrio de *Hardy-Weinberg*, esencial para realizar estudios genéticos poblacionales, como el cálculo del valor de diferenciación genética (F_{st}), análisis de varianza molecular (AMOVA), etc.

Tabla 30. Posibilidad de alelos nulos en las capturas analizadas de anchoveta peruana.

Captura	N	<i>P(a.n.)</i>	Alelo	Conteo	Het.	Hom.	Frecuencia	Frec. considerando a.n.
82	18	0.7420	02	6	0	3	0.1667	0.0382
			03	2	2	0	0.0556	0.0253
			04	4	0	2	0.1111	0.0253
			05	8	0	4	0.2222	0.0513
			06	14	2	6	0.3889	0.1054
			09	2	0	1	0.0556	0.0126
			Total individuos		2	16		
c	21	-0.0431	01	1	1	0	0.0238	0.0241
			02	3	3	0	0.0714	0.0740
			03	5	5	0	0.1190	0.1269
			04	4	4	0	0.0952	0.1001
			05	4	2	1	0.0952	0.0740
			06	24	12	6	0.5714	0.6199
			07	1	1	0	0.0238	0.0241
			Total individuos		14	7		
i	19	0.4800	02	8	2	3	0.2105	0.1070
			03	3	1	1	0.0789	0.0414
			04	8	2	3	0.2105	0.1070
			05	4	0	2	0.1053	0.0414
			06	13	5	4	0.3421	0.2028
			07	2	0	1	0.0526	0.0205
			Total individuos		5	14		
8c	34	0.2762	02	5	1	2	0.0735	0.0416
			03	7	3	2	0.1029	0.0704
			04	5	5	0	0.0735	0.0704
			05	2	0	1	0.0294	0.0137
			06	41	11	15	0.6029	0.4581
			09	6	2	2	0.0882	0.0559
			Total individuos					

			11	2	0	1	0.0294	0.0137
			Total individuos		11	23		
3p	43	0.2005	01	1	1	0	0.0116	0.0112
			02	10	6	2	0.1163	0.0937
			03	13	9	2	0.1512	0.1314
			04	7	3	2	0.0814	0.0575
			05	6	2	2	0.0698	0.0457
			06	38	16	11	0.4419	0.3697
			07	1	1	0	0.0116	0.0112
			09	3	1	1	0.0349	0.0226
			11	5	1	2	0.0581	0.0341
			14	2	2	0	0.0233	0.0226
			Total individuos		21	22		
103	17	0.3263	03	6	4	1	0.1765	0.1414
			04	13	1	6	0.3824	0.2050
			05	1	1	0	0.0294	0.0266
			06	13	5	4	0.3824	0.2741
			12	1	1	0	0.0294	0.0266
			Total individuos		6	11		
124	16	0.2888	02	3	1	1	0.0938	0.0590
			03	3	1	1	0.0938	0.0590
			04	8	4	2	0.2500	0.1899
			05	1	1	0	0.0313	0.0291
			06	10	4	3	0.3125	0.2260
			07	4	2	1	0.1250	0.0900
			08	2	0	1	0.0625	0.0291
			14	1	1	0	0.013	0.0291
			Total individuos		7	9		

N: número de individuos, P (a.n.): probabilidad de la existencia de alelos nulos, Het.: heterocigoto, Hom.: homocigoto, Frec.: frecuencia, a.n.: alelos nulos.

VI. DISCUSIÓN

VI.I. Extracción de ácidos nucleicos:

En este trabajo se demostró la efectividad del protocolo de extracción utilizando el *buffer* TNES-urea. Este es un método simple, reproducible, económico y no contaminante, posible de utilizar para la obtención de DNA a partir de muestras de tejido muscular. Mediante la amplificación de los marcadores ILPs y STRs, se confirmó su utilidad y reproducibilidad en estudios genéticos basados en PCR. Este protocolo de extracción puede substituir protocolos que utilizan elementos químicos contaminantes y peligrosos, como es el caso de protocolos con fenol-cloroformo (Madisen *et al.*, 1987). El DNA extraído a partir de tejido muscular tuvo mejor calidad que el extraído a partir de muestras de gónadas (Figura 7). Esto se debió a la menor presencia de componentes celulares (proteínas, lípidos), permitiendo la obtención de muestras de DNA más puras.

VI.II. Tamaño de muestra

El tamaño de muestra se considera óptimo, si se tiene en cuenta que la posibilidad de encontrar alelos en una frecuencia determinada está condicionada por el número de muestras analizadas y está expresado por la ecuación de Leung *et al.*, (1993): $N = \ln(1-P) / \ln(1-F)$, donde N= tamaño de muestra, P= probabilidad de encontrar el alelo y F= frecuencia del alelo. Así, para encontrar alelos en una frecuencia mayor al 0.05 son suficientes 45 individuos. Para la evaluación de los marcadores Mlc-3, Ck-7 y Ee10 se analizaron 124, 98 y 168 individuos respectivamente. Sin embargo, algunos alelos se encontraron con una frecuencia menor a 0.05 (0.01) (Tabla 8-13; 15-18).

VI. III. Amplificación y caracterización molecular de los loci STRs

La amplificación cruzada es una alternativa cuando no se cuenta con los marcadores moleculares identificados directamente en la especie de trabajo, además de que reduce el tiempo y los costos implicados en el aislamiento de estos. Varios trabajos reportan, además del aislamiento de los microsatélites en una especie específica, la amplificación de éstos en otras especies. Takagi *et al.* (1997) reportan cinco loci microsatélites aislados en el pez *Pragus major* y probados en otras especies de la familia Sparidae logrando amplificar de uno a cuatro loci.

Los 2 loci microsatélites con los que se trabajó en la presente tesis, fueron reportados para la anchoveta europea. Uno no logró amplificar bajo las condiciones ensayadas (Ee2), lo que indicaría que las regiones flanqueantes a este locus no se encuentran conservadas en la anchoveta peruana. En la anchoveta europea este locus registró un total de 25 alelos, 0.58 de heterocigosidad observada y amplicones entre 210-284pb.

El locus Ee10, en la anchoveta europea, registró un total de 25 alelos, 0.89 de heterocigosidad observada y productos entre 176-272pb. En el caso de la anchoveta peruana, en la presente tesis, se identificaron 12 alelos, 0.38 de heterocigosidad observada y productos entre 200 y 300pb.

VI.III.I. Déficit de heterocigotos del locus Ee10

Sin embargo, El locus Ee10 mostró en la mayoría de las poblaciones analizadas (con excepción de la captura “c”) deficiencia de heterocigotos (Tabla 29). Estos resultados concordarían con los reportados por Zarraonaindia *et al.* en el año 2009, donde para cuatro poblaciones de anchoveta europea que estudiaron utilizando siete microsatélites (microsatélites especie-específicos y otros reportados para la anchoveta japonesa *E. japonica*), todos estos loci mostraron un déficit de heterocigotos. Esta deficiencia puede

ser explicada por un apareamiento no al azar, el efecto Wahlund (este fenómeno se produce cuando dentro de una población existen subpoblaciones aisladas) y especialmente por la presencia de alelos nulos, o una combinación de todos estos factores.

Para explicar esta deficiencia de heterocigotos en el trabajo, se podría descartar la selección natural, puesto que si se tratarara de eso, el fenómeno se repetiría en todos los loci evaluados (ILPs y STRs).

Otra explicación para la deficiencia de heterocigotos puede deberse también al efecto Wahlund. La fuente clásica de este fenómeno es la inclusión de los individuos en una muestra que se ha originado a partir de poblaciones genéticamente diferenciadas. Los resultados de muchos otros estudios (Spanakis *et al.*, 1989; Bembo *et al.*, 1996; Magoulas *et al.*, 1996, 2006; Borsa, 2002; Borsa *et al.*, 2004) indican que a pesar de la falta general de las barreras de dispersión a lo largo de la costa, las poblaciones de anchoveta pueden estar subdivididas genéticamente. Individuos de estas poblaciones se pueden mezclar en diferentes momentos de sus vidas.

Finalmente, la presencia de alelos nulos podría contribuir al déficit de heterocigotos (DeWoody y Avise, 2000; O'Really *et al.*, 2004). La fuente más común de alelos nulos es el error en el PCR al momento de amplificar algunos alelos. Los *primers* utilizados en el presente estudio fueron diseñados para microsatélites en la anchoveta europea (Landi, 2005), y algunas amplificaciones cruzadas no fueron exitosas. Al calcular la probabilidad de existencia de alelos nulos del marcador Ee10 en la anchoveta peruana, el programa CERVUS arrojó un valor de 0.2005-0.7450 para las capturas estudiadas, estos valores no son despreciables (Tabla 29).

VI. IV. Amplificación y caracterización molecular de los marcadores intrónicos (ILPs)

El polimorfismo en la longitud de los intrones ha revelado la existencia de una gran variabilidad en varios estudios de genética de poblaciones. Muchos de estos estudios han sido restringidos inicialmente a pocos genes (Factor de elongación: EF 1 alfa, en *Penaeus vannamei*) y frecuentemente los intrones polimórficos han sido encontrados de forma ocasional (Bierne *et al.*, 2000). Para poder realizar la amplificación de los intrones, los *primers* utilizados en la PCR se sitúan en los exones. Una de las ventajas más importantes del uso de los intrones es que los *primers* por lo general son “universales” (France *et al.*, 1999).

Este es uno de los primeros trabajos, realizados mediante esta técnica, en la anchoveta peruana distribuida a lo largo del litoral peruano donde se utilizan herramientas genéticas moleculares.

En el trabajo de Hassan *et al.* (2002), se diseñaron *primers* a partir de regiones conservadas de exones consecutivos de diferentes genes, primero realizaron una búsqueda de las secuencias exónicas publicadas en las bases de datos hasta esa fecha en diferentes especies de peces teleósteos (Tabla 5). De esta manera, estos *primers* fueron diseñados para ser lo más universal posible y puedan amplificar en una amplia gama de peces teleósteos. De este mismo enfoque se valió Touriya *et al.* (2003).

De los 3 ILPs probados, sólo Gh5 no amplificó bajo las condiciones probadas, esto debido a que las secuencias flanqueantes al intrón (los exones) no estarían tan conservadas en la anchoveta peruana.

Al comparar el promedio de alelos por locus y de heterocigosidad observada, obtenidos en *E. ringens* con los marcadores ILPs, con los resultados reportados en la literatura (Tabla 6) se puede discutir lo siguiente:

VI.IV.I. Intrón 3 de la cadena ligera de la miosina (Mlc-3)

En la anchoveta europea, según Touriya *et al.* (2003), para el marcador Mlc-3 se reportó, a partir del análisis de tres individuos, amplicones de 460pb, este marcador resultó ser polimórfico para esta especie. En el presente trabajo, para la anchoveta peruana, se reporta productos con un peso promedio de 500pb, 10 alelos y una heterocigosidad de 0.243. Razón por la cual sólo se procedió a realizar el cálculo de heterocigosidades, observada y esperada, frecuencias alélicas y genotípicas, así como el valor Fis, esto debido al bajo grado de polimorfismo del marcador. El alelo predominante en la población de anchoveta peruana es el alelo 2, al igual que el genotipo 1, homocigoto para el alelo 2, de los 124 individuos analizados el 77% cuenta con este genotipo. Este intrón presenta una baja variabilidad genética, lo cual no lo hace apropiado para futuros análisis de estructura poblacional dentro de las especies. Los valores de heterocigosidad observada fueron variables en las capturas del stock centro, desde 0.05 hasta 0.300, mientras que el valor más alto se encontró en la captura “124” correspondiente al stock sur.

Es necesario tener en cuenta que a pesar de que los intrones acumulan rápidamente las mutaciones, los niveles de diversidad genética observados en varios trabajos realizados mediante el análisis con microsatélites son mayores a los que se obtiene con la técnica del EPIC-PCR. Lo que podría estar relacionado con la alta tasa de mutación que presentan los microsatélites lo cual conduce a un gran polimorfismo.

En la presente tesis se evaluó el polimorfismo en el tamaño del intrón, no el polimorfismo de secuencia, por lo cual no se descarta que exista un alto grado de polimorfismo si se analiza su secuencia.

VI.IV.II. Intrón 7 de la creatina quinasa (Ck-7)

Según Hassan *et al.* (2002), para la especie *Thunnus obesus*, atún ojo grande, se utilizaron 100 individuos y sólo se identificaron 3 alelos utilizando el marcador Ck-7 (Tabla 6). En esta tesis se analizaron 98 especímenes de anchoveta peruana y se identificaron 9 alelos y una heterocigosidad esperada de 0.611 mediante la técnica EPIC-PCR (Tabla 19). Las capturas correspondientes al stock centro (captura “c” e “i”) mostraron el valor más alto de heterocigosidad observada 0.666, mientras que la captura “3p” (stock norte) presentó la más baja 0.500. Estos valores de H_o indican que el marcador Ck-7 es un buen candidato para futuros estudios de genética de poblaciones en anchoveta peruana.

Utilizando el marcador Ck-7 se puede realizar algunos estudios preliminares en *E. ringens*. El valor de F_{st} global para *E. ringens* resultó ser bajo (0.02).

El análisis pareado de F_{st} entre las capturas del stock “norte” y “centro” (Tabla 20) que según los datos morfológicos corresponderían a una misma unidad poblacional, ratificaría esta hipótesis. Los resultados demuestran que no existe una estructura genética para la especie en las zonas evaluadas, esto es apoyado por el análisis de varianza molecular (Tabla 21).

No encontrar una estructura genética geográfica poblacional en esta especie no es un resultado desconcertante, los movimientos gregarios en las poblaciones de peces, especialmente de la anchoveta, toman lugar durante todas las fases de su ciclo de vida. Además, el medio oceánico no posee barreras tangibles como en los ambientes dulceacuícolas o terrestres, y por lo tanto la estructura genética de las poblaciones

marinas está condicionada por factores oceanográficos y características propias de las especies para la dispersión (Avice, 1994).

Los resultados de éste estudio sirven de base para futuras aplicaciones de los ILPs en *E. ringens*. Incluir más localidades a lo largo del rango de distribución de la especie y monitorear la diversidad genética con un mayor número de loci, permitirá tener una perspectiva completa y detallada de su estructuración genética.

VII. CONCLUSIONES

- La metodología de extracción de ácidos nucleicos, TNES-urea, ha servido para el aislamiento de DNA de la anchoveta peruana.
- Se demostró la utilidad de la estrategia de amplificación cruzada y de la técnica EPIC-PCR para poder obtener marcadores moleculares en especies sin información genética previa.
- Utilizando el marcador microsatélite Ee10, reportado para la anchoveta europea, casi todas las capturas presentaron desviaciones al equilibrio de *Hardy-Weinberg* (seis de siete), la principal razón en el déficit de heterocigotos se podría atribuir a la incidencia de alelos nulos.
- Basándonos en el nivel de polimorfismo, el marcador molecular, Ck-7, es un buen candidato para realizar estudios de genética de poblaciones. Mlc-3 mostró bajo nivel de polimorfismo y no constituye un buen candidato para estos fines.
- Según los resultados preliminares, utilizando el marcador Ck-7, no se detectó una diferenciación genética entre las localidades muestreadas, indicando que los stocks norte y centro de la anchoveta peruana, *E. ringens*, están conformados por una sola población.

- Estos resultados son un primer paso para el inicio de estudios que enfoquen y aclaren muchas interrogantes que se plantean no sólo para *E. ringens* (en cuanto a los stock reportados en el litoral peruano), sino también para otros recursos pesqueros de importancia económica para nuestro país.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ASAHIDA T., KOBAYASHI T., SAITOH K., MAKAYAMA I. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. 1996. Fish. Sci. 62:727-730.
- AVISE, J.C. Molecular markers, natural history and evolution. 2004. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc Publishers, Sunderland, U.S.A. 683p.
- BEMBO, D.G., CARVALHO, G.R., CINGOLANI, N., y PITCHER, T.J. Electrophoretic analysis of stock structure in northern Mediterranean anchovies, *Engraulis encrasicolus*. 1996. ICES Journal of Marine Science. 53:115-128.
- BIERNE, N., LEHNERT, A., BEDIER, E., BONHOMME, F. & MOORE, S. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC-PCR). 2000. Molecular Ecology. 9:233-235.
- BJÖRKLUND, M. A method for adjusting allele frequencies in the case of microsatellite allele drop out. 2005. Mol. Ecol. Notes. 5:676-679.
- BORSA, P. Allozyme, mitochondrial-DNA, and morphometric variability indicate cryptic species of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). 2002. Biological Journal of the Linnean Society, 75:261–269.
- BORSA, P., COLLET, A., and DURAND, J. D. Nuclear-DNA markers confirm the presence of two anchovy species in the Mediterranean. 2004. Comptes Rendus Biologies, 327:1113–1123.
- CAETANO-ANOLLÉS, G., BJ BASSAM and GRESSHOFF. DNA amplification fingerprinting using short arbitrary oligonucleotide primers. 1997. Bio/Technology 9:553-557.

- CALLEN D.F., THOMPSON A.D., SHEN Y. *et al.* Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. 1993. American Journal of Human Genetics, 52:922-927.
- CHAKRABORTY R., DANKER-HOPFE. Analysis of population structure: a comparative study of different estimator of Wright’s fixation indices. 1991. In: Handbook of statistics. 8:203-254.
- CHAMBERS, G., MACAVOY, E. Microsatellites: consensus and controversy. 2000. Comparative Biochemistry and Physiology Parte B 126pp:455-476.
- CHENG HH., LEVIN I., VALLEKO R.L., KHATIB H., DODGSON J.B. & CRITTENDEN L.B. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. 1995. Poultry Science 73:539-546.
- CHOW S., & HAZAMA K. Universal primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish. 1998. Mol. Ecol., 7: 1255-1256.
- CHOW, S. & TAKEYAMA, H. Intron length variation observed in the creatine kinase and ribosomal protein genes of the swordfish *Xiphias gladius*. 1008. Fisheries Science, 64:397-402.
- CHOW, S. Universal primer for calmodulin gene intron in fish. 1998. Fish. Sci. 64:999-1000.
- CROW, J.F. y KIMURA M. An introduction to population genetics theory. 1970. Harper and Row Publishers Inc New York.
- DEWOODY, J.A. y AVISE J.C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. 2000. Journal of Fish Biology. 56:461-473.
- FALCONE, D.S. y MACKAY T.F.C. Introduction to Quantitative Genetics. 1996. 4th Ed. Addison Wesley Longman, Harlow, Essex, UK.

- FERRADA, S.; HERNANDEZ, K.; MONTOYA, R. y GALLEGUILLLOS, R. Estudio poblacional del recurso anchoveta (*Engraulis ringens* Jenyns 1982) (Clupeiformes, Engraulidae), mediante análisis de DNA. *Gayana (Concepc.)* [online]. 2002, vol.66, n.2 [citado 2010-09-05], pp. 243-248. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-65382002000200022&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0717-6538. doi: 10.4067/S0717-65382002000200022
- GIBBS M., DAWSON D., MCCAMLEY C., WARDLE A.F., ARMOUR J.A.L & BURKE T. Chicken microsatellite markers isolated from libraries enriched for simple tandem repeats. 1997. *Animal Genetics* 28:401-417.
- HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. 1999. In "Microsatellites: Evolution and Applications" (D.B. Goldstein & C. Schlotterer, eds) (Oxford University Press) pp.1-9.
- HART D.L. & CLARK A.G. Principles of Population Genetics. 1989. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- HASSAN, M., LEMAIRE C., FAUVELOT C., & BONHOMME, F. Seventeen new exon-primed intron-crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish. 2002. *Mol. Ecol. Notes*, 2:334-340.
- HE, M. y HAYMER D.S. Polymorphic intron sequences detected within and between populations of the Oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) 1997. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90:825-831.
- LANDI M., GAROIA F., PICCINETTI C. & TINTI F. Isolation of polymorphic microsatellite loci from the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. 2005. *Molecular Ecology Notes* 5:266-268.

- LESSA, E. Rapid Surveying of DNA sequence variation in natural populations. 1992. Mol. Biol. Evol. 9:323-330.
- LEUNG, H.; NELSON, R.; LEACH, J. Population structure in plant pathogenic fungi and bacteria. 1993. Advances in Plant Pathology 10:157-206.
- LUIKART, G. & ENGLAND P.R. Statistical analysis of microsatellite DNA data. 1999. Trends in Ecology and Evolution 14:253-256.
- MADISEN L., HOAR DI, HOLROYD CD, CRISP M, HODES ME. DNA banking: the effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. Am. J. Med. Gent. 1987. 27:379-390.
- MAGOULAS, A., CASTILHO, R., CAETANO, S., MARCATO, S., and PATRNAELLO. Mitochondrial DNA reveals a mosaic pattern of phylogeographical structure in Atlantic and Mediterranean populations of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). 2006. Molecular Phylogenetics and Evolution. 39:734–746.
- MAGOULAS, A., TSIMENIDES, N., and ZOURUS, E. Mitochondrial DNA phylogeny and reconstruction of the population history of a species: the case of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*). 1996. Molecular Biology and Evolution, 13:178–190.
- MENDO J. Stock identification of Peruvian anchoveta (*Engraulis ringens*): morphometric, tagging/recapture, electrophoretic and ecological studie. 1991. Ph D. Thesis, Univ. Bremen, Alemania.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided population. 1973. Proceeding of the National Academy of Science, USA. 70:3321-3323.
- O'REALLY, P.T., CANINO, M.F. BAILEY, K.M., y BENTZEN P. Inverse relationship between F_{st} and microsatellite polymorphism in the marine fish,

walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*): implications for resolving weak population structure. 2004. *Molecular Ecology*. 13:1799-1814.

- O'BRIEN, S.J. Molecular genome mapping lessons and prospects. 1991. *Curr. Opin. Gent. Dev.* 1:105-111.
- OHRESSER, M., BORSA P., & DELSERT C. Intron length polymorphism at the actin gene locus mac-1: a genetic marker for population studies in the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk and *M. edulis* L. 1997. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6:123-130.
- PALUMBI R. 1996. Nucleic Acids II: The polymerase Chain Reaction. In: Hillis, D., C. Moritz & B. Mable, eds.: *Molecular Systematics*. pp. 205-247.
- PALUMBI, S., & BAKER C. Contrasting population structure from nuclear and mtDNA of humpback whales. 1994. *Mol. Biol. Evol.*, 11:426-435.
- PAULY, D. and I. TSUKAYAMA. The Peruvian anchovy and its upwelling ecosystem: three decades of change. *ICLARM Studies and Reviews* 15, 351p. Instituto del Perú (IMARPE), Callao, Perú, Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), GmbH, Eschborn, Federal Republic of Germany; and International Center for Living Aquatic Resources Management (ICLARM), Manila, Philippines.
- PRIMMER, C.R., H. ELLEGREN. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. 1998. *Mol. Biol. Evol.* 15:997-1008.
- SCHLOTTERER, C., TAUTZ D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. 1992. *Nucleic Acids Research* 20(2):211-215.
- SPANAKIS, E., TSIMENIDES, N., y ZOUROS, E. Genetic differences between populations of sardine, *Sardina pilchardus*, and anchovy, *Engraulis encrasicolus*, in the Aegean and Ionian seas. 1989. *Journal of Fish Biology*. 35:417-437.

- SUMMERS, K. y AMOS B. Behavioral ecological and molecular genetic analyses of reproductive strategies in the Amazonian dart-poison frog, *Dendrobates ventrimaculatus*. 1997. Behavioral Ecology. 8:260-267.
- SUNNUCKS, P. WILSON A.C.C., BEHEREGARAY L.B. ZENGER K., FRENCH J., y TAYLOR A.C. SSCP in not so difficult the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. 2000. Mol. Ecol. 9:1699-1710.
- TAKAGI, M., N. TANIGUCHI, D. COOK y R.W. DOYLE. 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci from red sea bream *Pagrus major* and detection in closely related species. Fisheries Science, 63(2):199-204.
- TAUTZ, D. & SCHLOTTETER, C. Simple sequences. 1994. Curr. Opin. Genet. Dev. 4:832-837.
- TAUTZ, D., TRICK, M., & DOVER, G. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. 1986. Nature (London) 322:652-656.
- TOURIYA A., RAMI M., CATTANEO-BERREBI G., IBANEZ C., AUGROS S., BOISSIN E., DAKKAK A. & BERREBI P. Primers for EPIC amplification of intron sequences for fish and other vertebrate population genetic studies. 2003. BioTechniques 35:676-682.
- WELLEK, S. Test for establishing compatibility of an observed genotype distribution with Hardy-Weinberg equilibrium in the case of a biallelic locus. 2004. Biometrics. 60:694-703.
- WRIGHT, S. The genetic structure of populations. 1951. Annals of Eugenics 15:323-354.